

**Der Arf-GEF Schizo fördert die Fusion der Myoblasten über die
Aktivierung der D-Arf1-GTPase während der frühen Myogenese von
Drosophila melanogaster, während der Arf-GAP D-Git in Kooperation mit
D-Arf6 die Wegfindung der Muskeln in der späten Myogenese beeinflusst**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christine Dottermusch

aus Dresden

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am 08.10.2010.

Erstgutachter: Prof. Dr. Susanne-Filiz Önel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am: 19.10.2010

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	2
2.1.	Vorwort	2
2.2.	Die somatische Myogenese in <i>Drosophila</i>	2
2.2.1.	Spezifikation von FCs und FCMs - Voraussetzung für eine erfolgreiche Fusion.....	2
2.2.2.	Zwei-Phasen Modelle der Fusion und stabile Anheftung der Muskeln	3
2.2.3.	Die Erkennung, Migration und Adhäsion zwischen FCs und FCMs erfolgt durch Transmembranmoleküle der Ig-Superfamilie.....	5
2.2.4.	Die Rolle des Aktin-Zytoskelettes während der Myogenese in <i>Drosophila</i>	5
2.2.5.	Die Funktion von kleinen GTPasen und deren Regulatoren.....	7
2.3.	Die Familie der ADP-Ribosylierungsfaktoren (Arf).....	9
2.4.	Die Regulation der Arf-GTPasen erfolgt durch Arf-GEFs und Arf-GAPs.....	10
2.4.1.	Arf-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (Arf-GEFs).....	10
2.4.2.	Arf-GTPase aktivierende Proteine (Arf-GAPs).....	11
2.5.	Zielstellung	13
3.	ERGEBNISSE	14
3.1.	Charakterisierung des <i>schizo</i> Allels <i>schizo</i>^{CI-28}	14
3.1.1.	Einführung in bekannte <i>schizo</i> Allele	14
3.1.2.	Das Allel <i>schizo</i> ^{CI-28} weist keine Mutation im kodierenden Bereich von <i>schizo</i> auf	14
3.1.3.	In <i>schizo</i> ^{CI-28} mutanten Embryonen findet Transkription der <i>schizo</i> mRNA statt	15
3.1.4.	<i>schizo</i> ^{CI-28} Mutanten zeigen einen drastischen Fusionsdefekt.....	17
3.2.	Die Funktion von Schizo wird in FCs und FCMs benötigt	19
3.2.1.	Der <i>schizo</i> ^{CI-28} Fusionsdefekt lässt sich durch die Expression von Schizo im gesamten Mesoderm retten	19
3.2.2.	Schizo interagiert direkt mit den Ig-Transmembran-Rezeptoren Rst und Sns	20
3.3.	Untersuchungen zur Funktion von Schizo als Arf-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor und zur Relevanz der Arf-GTPasen während der Myoblastenfusion	21
3.3.1.	mRNA-Verteilung von <i>Drosophila d-arf1</i> , <i>d-arf2</i> und <i>d-arf6</i>	22
3.3.2.	Überexpressionsanalysen und Rettungsexperimente mit GDP-gebundenen und GTP-gebundenen Varianten der <i>Drosophila</i> Arf Proteine	22
3.3.3.	Der Verlust von zygotischem <i>d-arf1</i> resultiert nicht in Fusionsstörungen.....	31
3.3.4.	Epistasisexperimente zur Aufklärung der genetischen Interaktion zwischen <i>schizo</i> , <i>d-arf1</i> und <i>d-arf6</i>	34
3.3.5.	Schizo interagiert im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit der GDP-gebundenen Form von D-Arf1	36
3.3.6.	Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Schizo in COS7-Zellen	37
3.3.7.	Übersicht über die Analysen zur Funktion des Arf-GEFs Schizo in der Aktivierung der Arf-GTPasen während der Myoblastenfusion von <i>Drosophila melanogaster</i>	40
3.4.	Untersuchungen zur Funktion von Schizo in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts.....	41
3.4.1.	<i>schizo</i> und <i>rac1</i> zeigen keine genetische Interaktion.....	41
3.4.2.	Der <i>schizo</i> ^{CI-28} Myoblastenfusionsphänotyp lässt sich durch die Überexpression von wildtypischen oder konstitutiv-aktiven Rac1 nicht retten und frühe mesodermale Expression von Rac1 ^{G12V} führt zu Myogenese-Defekten	42
3.4.3.	Es findet kein Zusammenspiel zwischen Arf-GTPasen und Rac1 statt	44
3.4.4.	<i>scar</i> ; <i>rac1</i> Doppelmutanten zeigen einen deutlichen Fusionsdefekt.....	45
3.4.5.	Der <i>schizo</i> ^{CI-28} Fusionsphänotyp lässt sich durch die Expression von Scar nicht retten und <i>schizo</i> und <i>scar</i> interagieren nicht genetisch	46

3.4.6.	Übersicht über die Gendosis- und Rettungsexperimente zur Aufklärung der möglichen Funktion von Schizo im Rac1->Scar Signalweg	47
3.4.7.	<i>schizo</i> zeigt keine genetische Interaktion mit <i>wasp</i>	47
3.5.	Identifizierung des mesodermal exprimierten Arf-GTPase aktivierende Proteins D-Git und seine Funktion in der Muskelanheftung und Wegfindung.....	48
3.5.1.	Arf-GTPase aktivierende Proteine in <i>Drosophila</i>	48
3.5.2.	Analyse von genomischen Defizienzen für <i>d-git</i>	50
3.5.3.	Isolierung und molekulare Charakterisierung der Deletionsmutante <i>d-git</i> ^{Δa}	50
3.5.4.	Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutante <i>d-git</i> ^{Δa}	51
3.5.5.	D-Git agiert wahrscheinlich nicht in funktionieller Redundanz mit RhoGAP15B	54
3.5.6.	D-Git lokalisiert an den Enden der Muskeln nahe der Muskelanheftungsstellen	55
3.5.7.	Untersuchungen zur Funktion von D-Git als Arf-GAP – D-Git als möglicher Regulator für D-Arf6	57
3.5.8.	Die Interaktion mit dem Adaptormolekül Paxillin scheint nicht für die Lokalisation von D-Git an die Muskelanheftungsstellen sowie für die Wegfindung der Muskeln essentiell zu sein	63
3.5.9.	Die ANK-Wiederholungen und die SH-Domäne werden für die Lokalisation von D-Git an die Muskelanheftungsstellen benötigt	67
3.5.10.	D-Git zeigt eine intramolekulare Interaktion	68
4.	DISKUSSION	70
4.1.	Charakterisierung des <i>schizo</i> Allels <i>schizo</i>^{C1-28} – Schizo wird für die initiale Fusion von FCs und FCMs benötigt.....	70
4.2.	Schizo agiert als unkonventioneller GEF für D-Arf1	72
4.2.1.	Einfluss der Sec7-Domäne auf die Substratspezifität	74
4.2.2.	Einfluss der benachbarten PH-Domäne auf Substratspezifität	74
4.2.3.	Möglichkeiten, um die Funktion von D-Arf1 in der Myoblastenfusion <i>in vivo</i> zu verifizieren	75
4.2.4.	Überexpression von GTP-gebundenem D-Arf1 resultiert in Defekten in der Muskulatur.....	76
4.3.	Die mögliche Rolle von Schizo in der Myoblastenfusion.....	77
4.3.1.	Schizo ist nicht in der lokalen F-Aktin Regulation involviert	77
4.3.2.	Schizo könnte die Fusion durch die Bereitstellung von speziellen Phospholipiden fördern	79
4.3.3.	Schizo interagiert mit den Kontakt-vermittelnden Rezeptoren der Ig Superfamilie	81
4.3.4.	Arf-GTPasen könnten eine zusätzliche Funktion bei der Anheftung der Muskeln spielen.....	84
4.4.	Die Funktion des Arf-GAPs D-Git in der Myogenese von <i>Drosophila</i>	85
4.4.1.	Der Arf-GAP D-Git ist kein Regulator der Myoblastenfusion	85
4.4.2.	Der ArfGAP D-Git kontrolliert die Wegfindung der Muskeln zu ihren epidermalen Anheftungsstellen	87
4.4.3.	D-Git wirkt als ein ArfGAP für die D-Arf6 GTPase	87
5.	MATERIAL UND METHODEN	94
5.1.	Material	94
5.1.1.	Chemikalien	94
5.1.2.	Allgemeine Lösungen.....	94
5.1.3.	Allgemeine Puffer	95
5.1.4.	Verwendete Enzyme.....	95
5.1.5.	Verwendete Kits und Sonstiges	95
5.1.6.	Geräte	96
5.1.7.	Bakterienstämme	96
5.1.8.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme	97
5.1.9.	Verwendete PLasmide.....	97
5.1.10.	Antibiotika, Medien und Agar-Platten.....	98

5.1.11. Verwendete cDNA's	98
5.1.12. Primer.....	98
5.1.13. Primäre Antikörper.....	102
5.1.14. Sekundäre Antikörper.....	102
5.1.15. Fliegenstämme	103
5.2. Arbeiten mit dem Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>	106
5.2.1. Haltung von Fliegenstämmen	106
5.2.2. Embryonenablagen	106
5.2.3. P-Element Keimbahntransformation durch Mikroinjektion	106
5.2.4. Umbalancieren und Mehrfachmarkierung von Chromosomen.....	109
5.2.5. Herstellung von Doppelmutanten.....	109
5.2.6. Meiotische Rekombination oder Herstellung von Rekombinanten	110
5.2.7. P-Element Exzisionsmutagenese	111
5.2.8. Ektopische Expression durch das UAS/Gal4-System.....	112
5.2.9. Sterilitätstests	112
5.2.10. Bestimmung der Letalität für die einzelnen Entwicklungsstadien.....	112
5.3. Histologische Methoden	112
5.3.1. Formaldehyd-Fixierung von <i>Drosophila</i> -Embryonen	112
5.3.2. Hitzefixierung.....	113
5.3.3. <i>whole mount</i> -Antikörperfärbungen an <i>Drosophila</i> Embryonen.....	113
5.3.4. <i>whole-mount in situ</i> -Hybridisierungen an <i>Drosophila</i> Embryonen	114
5.3.5. Herstellen von Dauerpräparaten	115
5.4. Molekularbiologische Methoden	116
5.4.1. Präparation genomischer DNA aus <i>Drosophila</i> nach der Single-Fly-Methode	116
5.4.2. Präparation von genomischer DNA aus <i>Drosophila melanogaster</i>	116
5.4.3. Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen	116
5.4.4. Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	117
5.4.5. Topo-Klonierung von PCR-Produkten	117
5.4.6. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. Coli</i> (alkalische Lyse)	118
5.4.7. Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. Coli</i>	118
5.4.8. Aufreinigung von DNA durch Ethanolpräzipitation.....	119
5.4.9. Aufreinigung von DNA durch Isopropanolpräzipitation	119
5.4.10. Analytischer Restriktionsverdau.....	119
5.4.11. Präparativer Restriktionsverdau	119
5.4.12. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	119
5.4.13. Dephosphorylierung von 5' Phosphatenden	120
5.4.14. Ligation	120
5.4.15. In-Fusion Klonierung	120
5.4.16. Gerichtete Klonierung von PCR-Produkten mit 5'CACC-Überhang in den pENTR/D-Topo	121
5.4.17. Gateway® -Klonierung	121
5.4.18. Transformation von DNA in <i>E. coli</i>	122
5.4.19. Sequenzierung.....	123
5.5. Methoden Hefe-Zwei-Hybrid-System	123
5.5.1. Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.....	123
5.5.2. Hefe-Nährmedien	123
5.5.3. Wachstum und Anzucht der Hefekulturen.....	124
5.5.4. Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen (PEG/LiAc-Methode).....	125

5.5.5.	Interaktionstest der Kotransformanden.....	126
6.	LITERATUR.....	127
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	138
8.	ANHANG.....	139
8.1.	Auflistung der Gene in den verwendeten Defizienzen.....	139
8.1.1.	Df(3L)ED5017	139
8.1.2.	Df(2L)ED1231	140
8.1.3.	Df(1)ED7374.....	141
9.	DANKSAGUNG	142
10.	ERKLÄRUNG.....	144
11.	VORLÄUFIGE PUBLIKATIONSLISTE	145

1. ZUSAMMENFASSUNG

In *Drosophila melanogaster* entstehen die mehrkernigen Muskeln der Körperwandmuskulatur durch die heterologe Fusion von Founderzellen (FCs) und Fusions-kompetenten Myoblasten (FCMs). Mutanten für das Gen *schizo* weisen nur unfusionierte Myoblasten auf, was auf eine essentielle Funktion dieses Gens für den Fusionsprozess hinweist. Zelltyp-spezifische Rettungsexperimente konnten zeigen, dass Schizo sowohl in FCs als auch in FCMs benötigt wird. Schizo kodiert für einen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF), welcher den GDP/GTP-Austausch an Arf-GTPasen katalysiert. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, zu analysieren, welche der *Drosophila* Arf-GTPasen, D-Arf1, D-Arf2 oder D-Arf6, während der Myoblastenfusion von Schizo aktiviert wird. Anders als das Vertebraten Homolog Brag2 scheint Schizo die Myoblastenfusion über die Aktivierung der D-Arf1-GTPase und nicht der D-Arf6-GTPase zu fördern, da die Einführung der aktivierten Form von D-Arf1 eine partielle Rettung des *schizo* induzierten Fusionsdefekt bewirkte. Diese Vermutung wird zudem durch Hefe-Zwei-Hybrid-Daten unterstützt, in denen eine Interaktion zwischen Schizo und der GDP-gebundenen Form beobachtet werden konnte. Jedoch resultierte der Verlust der D-Arf1-Aktivität nicht in Fusionsstörungen. Dies könnte durch die maternal bereitgestellte mRNA von *d-arf1* oder durch eine funktionelle Redundanz mit D-Arf2 begründet sein, da eine funktionelle Redundanz mit D-Arf6 ausgeschlossen werden konnte. Genetische Interaktionsstudien und Rettungsexperimente mit bekannten Aktin-Regulatoren widerlegen zudem die Vermutung von Chen et al. (2003), dass Schizo über die Lokalisation der Rac-GTPase an der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist und stehen im Einklang damit, dass Schizo ein GEF für D-Arf1 ist.

Des Weiteren wurde das mRNA Verteilungsmuster von *Drosophila* Arf-GTPase-aktivierende Proteinen (Arf-GAPs) untersucht, die möglicherweise an der Hydrolyse des D-Arf1-GTP während der Myoblastenfusion beteiligt sein könnten. Unter diesen konnte das *Drosophila* Homolog von Git1, D-Git, als im Mesoderm angereicherter Arf-GAP identifiziert werden. Die in dieser Arbeit erfolgreich generierten Mutanten für *d-git* zeigen zwar keine Fusionsdefekte, weisen jedoch Fehler in der Wegfindung und Morphogenese insbesondere der ventralen Muskeln auf. Während der Wegfindung strecken sich mehrkernige Muskeln in Richtung ihrer epidermalen Anheftungsstelle, wobei sie an ihren Enden Aktin-reiche Filopodien ausbilden, welche die Umgebung auf leitende Signale absuchen. In Übereinstimmung mit einer Funktion von D-Git in den späten Aspekten der Muskelentwicklung befindet sich das D-Git Protein konzentriert an den Enden der wachsenden Muskeln. Interaktions- und Lokalisationsstudien mit dem Adhäsions-assoziiertem Protein Paxillin zeigen, dass die Wegfindung der Muskeln nicht mit der Integrin-vermittelten Adhäsion der Muskeln gekoppelt ist. Genetische Interaktionsstudien konnten jedoch belegen, dass D-Git während der Wegfindung der Muskeln mit der D-Arf6-GTPase kooperiert, wodurch es wahrscheinlich externe Wegfindungssignale auf das Aktin-Zytoskelett und/oder den Membrantransport in den Enden der Muskeln überträgt.

2. EINLEITUNG

2.1. Vorwort

Die Bewegungen unseres Körpers sind in der Skelettmuskulatur begründet, welche während der embryonalen Entwicklung etabliert wird. Diese Skelettmuskulatur besteht gewöhnlicherweise aus einem Bündel von mehrkernigen Muskelfasern, die durch die morphologische Eigenschaften wie Größe, Form, Innervierung und Anheftung unterschieden werden können. Doch genau diese einzigartigen Eigenschaften ermöglichen die Diversität zwischen den einzelnen Muskeln und die damit verbundenen vielfältigen Bewegungsabläufe unseres Körpers. Die Entwicklung dieser Muskulatur benötigt eine genau abgestimmte Folge an zellulären Ereignissen, nämlich der Zell-Zell-Fusion, um mehrkernige Myotuben zu generieren, der gerichteten Migration sowie die finale Anheftung der Muskeln. Das wachsende Verständnis der Entwicklung der Skelettmuskulatur kann in Zukunft helfen, Therapien für muskelspezifische Krankheiten wie Muskeldystrophien zu entwickeln. Einer der Modellorganismen, in dem die Bildung der Muskulatur seit geraumer Zeit studiert wird, ist die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Auch in *Drosophila* entstehen mehrkernige Muskeln durch die Fusion von mesodermalen Zellen, den Myoblasten. Im Gegensatz zu der Muskulatur der Wirbeltiere besteht jedoch in *Drosophila* jeder Muskel aus einer einzigen Muskelfaser. Die komplette Myogenese angefangen von der Spezifikation der Myoblasten bis hin zu der vollständigen Anheftung der Muskeln an die Epidermis vollzieht sich in etwa 12 Stunden während der Embryogenese. Zusammen mit der Tatsache, dass viele fusionsrelevante Moleküle evolutionär konserviert sind (Krauss, 2005; Rochlin et al., 2009; Önel et al., 2010), macht *Drosophila* zu einem idealen Forschungsobjekt.

2.2. Die somatische Myogenese in *Drosophila*

2.2.1. Spezifikation von FCs und FCMs - Voraussetzung für eine erfolgreiche Fusion

In *Drosophila* vollzieht sich die Bildung der mehrkernigen Muskeln durch die Fusion von zwei Myoblastenpopulationen, den Gründer- oder Founderzellen (FC) und den Fusionskompetenten Myblasten (FCM). Beide Myoblastenpopulationen entstammen aus dem somatischen Mesoderm, welches durch die Expression des basischen Helix-Loop-Helix-(bHLH) Transkriptionsfaktors Twist (Twi) spezifiziert wird (Baylies & Bate, 1996). Das somatische Mesoderm wird mittels mesodermaler und ektodermaler Signale weiter in sogenannte Äquivalenzgruppen unterteilt, in denen mittels lateraler Inhibition, gefolgt durch asymmetrische Zellteilung eine distinkte Anzahl an FCs selektioniert wird (Carmena et al., 1995; 1998). FCs beginnen mit der Expression eines charakteristischen Musters an Transkriptionsfaktoren, die in ihrer Funktion als Muskel-Identitätsgene die einzigartige Morphologie

des zukünftigen Muskels, wie Größe, Form, Lage und Anheftung an die Epidermis, spezifizieren (Abb. 1B) (Reviews: Baylies et al., 1998; Frasch et al., 1999; Maqbool et al., 2007). Die übrigen Zellen einer jeder myogenen Äquivalenzgruppe differenzieren zu FCMs (Bate, 1993; Baylies et al., 1998), in denen das Gli-ähnliche Zink-Finger-Protein Lameduck (Lmd)/Myoblast incompetent (Minc)/Gleefull (Gfl) die Expression von FCM-spezifischen Genen anschaltet (Duan et al., 2001; Ruiz-Gomez et al., 2002; Furlong et al., 2001). Nach erfolgter Fusion übernehmen die FCMs das exklusive genetische Programm der FC, mit denen sie fusioniert sind (Baylies et al., 1998). Lange Zeit wurde angenommen, dass FCMs eine eher uniforme Myoblastenpopulation darstellen, die den zukünftigen Muskeln Masse bereitstellen. Jedoch lassen neuere Studien erkennen, dass sich auch die FCMs auf molekularem Level unterscheiden (Estrada et al., 2006; Richardson et al., 2008a; Diskussion in Rochlin et al., 2009). Der von Twi aktivierte MADS-Box Transkriptionsfaktor Myocyte-specific enhancer factor 2 (Mef2; Lilly et al., 1994; Taylor et al., 1994; Bour et al., 1995; Cripps et al., 1998) hingegen ist nicht für die frühe Spezifikation zuständig, sondern reguliert in Kooperation mit Twi die Expression von Muskel-spezifischen Genen, die vor allem für die Differenzierung der Muskeln notwendig sind (Sandmann et al., 2006).

2.2.2. Zwei-Phasen Modelle der Fusion und stabile Anheftung der Muskeln

Basierend auf der Analyse von Mutanten und ultrastrukturellen Studien wurde postuliert, dass die Myoblastenfusion in zwei distinkten Schritten abläuft und jeder Fusionsschritt unterschiedliche Genprodukte sowie subzelluläre Ereignisse fordert (Bate, 1990; Rau et al., 2001; Berger et al., 2008; Review: Önel & Renkawitz-Pohl, 2009). Während der ersten Fusionsphase fusioniert dabei eine FC mit ein bis zwei FCMs, um einen zwei- bis dreikernigen Vorläufermuskel zu bilden (Abb. 1A-1) (Rau et al., 2001). Die endgültige Größe eines Muskels wird während der zweiten Fusionsphase durch die sukzessive Rekrutierung und Fusion von einer Muskel-spezifischen Anzahl von weiteren FCMs erreicht (Abb. 1A-2). Die finale Größe der Muskeln reicht dabei von 4-kernigen Muskeln bis hin zu Muskeln mit 25 Kernen (Bate, 1990). Andererseits existiert die Vorstellung, dass alle Fusionen nach dem gleichen Mechanismus, jedoch in zwei zeitlich aufeinanderfolgenden Phasen ablaufen (Beckett & Baylies, 2007; Richardson et al., 2008b). Dabei findet eine begrenzte Anzahl an Fusionen zwischen FCs und direkt benachbarten FCMs während der Stadien 11 und 12 statt, während der Hauptanteil der Fusionen nach der Rekrutierung weiterer FCMs während der Stadien 14 und 15 erfolgt.

Bereits während die Muskeln durch reiterative Fusionsereignisse an Größe gewinnen, starten die Muskeln in Richtung ihrer epidermalen Anheftungsstellen, den Tendonzellen, zu migrieren. Dabei senden sie am distalen und proximalen Ende extensive Filopodien aus, die die Umgebung auf spezifische Signale absuchen, welche die Muskelenden in Richtung ihrer Tendonzelle leiten (Abb. 1A-2) (siehe Review Schnorrer & Dickson, 2004). Sobald die Muskeln ihre korrekte Anheftungsstelle erreicht haben, stoppen diese ihre Elongation und bilden nach Kontakt mit den Tendonzellen ein verbreitertes Ende aus, an dem eine sich ein stabiler Adhäsionskomplex ausbildet (Abb. 1A-3). Dies

wird durch die hoch konservierten Transmembran-Rezeptoren der Integrin Familie und dem Aufbau einer extrazellulären Matrix (ECM) gewährleistet (Bökel & Brown, 2002). Die Anheftung der Muskeln vollzieht sich dabei als ein sequentieller Prozess. Nach dem initialen, transienten Kontakt zwischen Muskel und Tendonzelle wird der Aufbau einer Hemi-Adhäsions-ähnlichen Struktur initiiert. Folgende Integrin-Aktivierung löst die starke Assoziation der Integrine mit der ECM aus und stabilisiert die Anheftung der Muskeln, bereits bevor die ersten Muskelkontraktionen stattfinden (Brown et al., 2000; Prokop et al., 1998; Tepass & Hartenstein, 1994). Der Verlust der Integrin-Rezeptoren oder deren assoziierten Komponenten resultiert typischerweise in der Ablösung der Muskeln von ihren Anheftungsstellen und dem damit verbundenen Auftreten von runden, sphärischen Muskeln (Bökel & Brown, 2002; Brown et al., 2000).

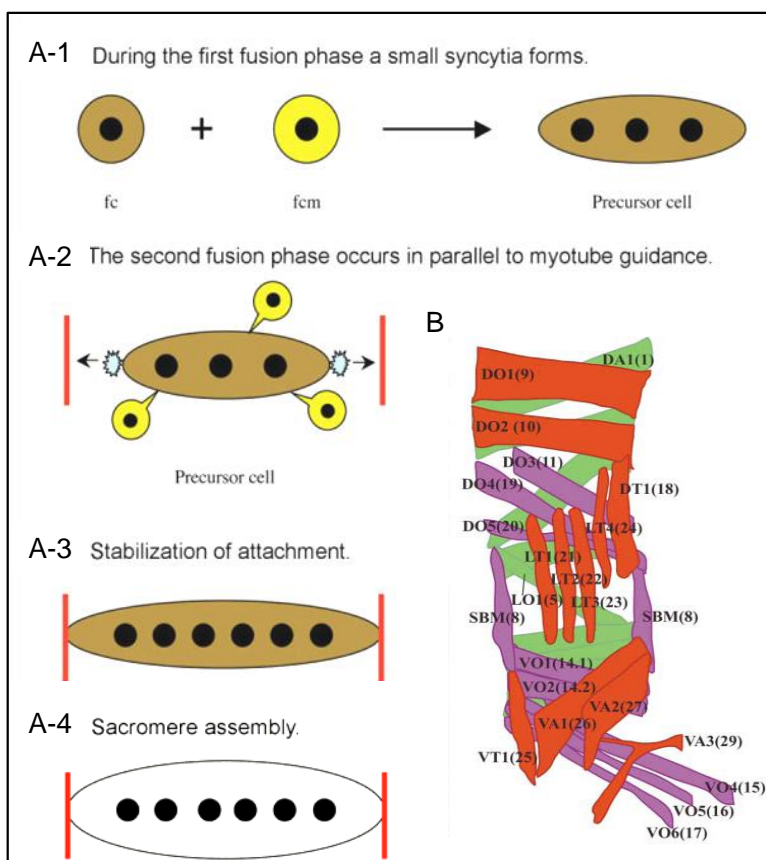


Abb. 1 Schematische Darstellung der Myoblastenfusion, der Muskelanheftung und des Sarkomeraufbaus
 Nach erfolgter Spezifikation von Gründer- oder Founderzelle (FC) und Fusionskompetenten Myoblasten (FCM) fusionieren diese in zwei Phasen, um einen mehrkernigen Muskel zu bilden. **A-1)** Während der ersten Fusionsphase fusioniert eine FC mit ein bis zwei FCMs, um einen zwei- bis dreikernigen Muskelvorläufer oder Precursor zu generieren. **A-2)** Während der zweiten Phase fusioniert dieser Vorläufermuskel mit einer Muskel-spezifischen Anzahl an weiteren FCMs. Parallel zu den Fusionsereignissen migrieren die wachsenden Muskeln in Richtung (Pfeile) ihrer epidermalen Anheftungsstelle (rot). Dabei senden sie Filopodien aus (grau). **A-3)** Aufbau eines stabilen Adhäsionskomplexes an den Anheftungsstellen. **A-4)** Aufbau der Sarkomer-Struktur in den Muskeln. **B)** Stereotypisches Muster der 30 Muskeln in den Hemisegmenten A2-A7. Namen charakteristischer Muskeln sind angegeben. Abbildungen entnommen aus Önel & Renkawitz-Pohl (2009) (A1-4), sowie Schnorrer & Dickson (2004) (B) und weiter modifiziert.

2.2.3. Die Erkennung, Migration und Adhäsion zwischen FCs und FCMs erfolgt durch Transmembranmoleküle der Ig-Superfamilie

In *Drosophila* erfolgt die Fusion der Myoblasten *in vivo* ausschließlich heterolog zwischen FC/wachsendem Muskel und FCM und niemals zwischen zwei FCs oder zwei FCMs. Diese Spezifität wird durch die zelltypspezifische Expression der Transmembranmoleküle der Immunglobulin(Ig)-Superfamilie gewährleistet. Dumbfounded (Duf; auch als Kin of IrreC bekannt) wird spezifisch in FCs/wachsenden Muskeln exprimiert (Ruiz-Gomez et al., 2000), während Sticks and Stones (Sns; Bour et al., 2000) und sein Paralog Hibris (Hbs; Artero et al., 2001; Dworak et al., 2001) auf Seite der FCMs präsentiert wird. Das vierte Ig-Transmembranmolekül Roughest (Rst; auch als Irregular Optic Chiasma bekannt) wird hingegen in beiden Myoblastenpopulationen exprimiert (Strunkelnberg et al., 2001), wobei die Funktion von Rst in FCMs nicht genau geklärt ist (Shelton et al., 2009). In FCs/wachsende Muskeln agieren Duf und Rst in funktionieller Redundanz und üben eine chemoattraktive Wirkung auf FCMs aus (Ruiz-Gomez et al., 2000; Strunkelnberg et al., 2001). Erkennung, Migration und Adhäsion zwischen FC/wachsenden Muskel und FCM wird dabei über die direkte Interaktion mit Sns gewährleistet, wobei Sns in FCMs in partieller Redundanz mit Hbs agiert (Shelton et al., 2009). Der Verlust der Ig-Rezeptoren vermittelten Interaktion zwischen FCs und FCMs resultiert in einem kompletten Fusionsdefekt (Ruiz-Gomez et al., 2000; Strunkelnberg et al., 2000; Bour et al., 2000).

Interessanterweise zeigen Duf, Rst und Sns eine sehr dynamische Expression während der Myoblastenfusion. Erfolgreiche Erkennung und Adhäsion zwischen FC und FCMs bzw. zwischen wachsenden Muskeln und FCMs führt zu einer Anreicherung der Transmembranmoleküle an den Kontaktstellen zwischen den Myoblasten (Kesper et al., 2007). Duf, Rst und Sns ordnen sich dabei in einer Ring-ähnlichen Struktur an, dessen Durchmesser von 1 µm bis hin zu 5 µm reicht (Kesper et al., 2007). Da die fusionierenden Myoblasten einen Durchmesser von 5 µm aufweisen, wurde postuliert, dass diese als Fusion-Restricted-Myogenic-Adhesive-Structure (FuRMAS) bezeichnete Struktur das Fusionsereignis am wachsenden Muskel lokal begrenzt (Önel et al., 2010). Dabei dienen die FuRMAS als eine Signal-Plattform, die über die intrazellulären Domänen der Transmembran-Rezeptoren die erfolgreiche Adhäsion zwischen FCs/wachsenden Muskeln und FCM in beide Zelltypen weiterleitet und fusionsrelevante Moleküle an die Kontaktstelle der Myoblasten rekrutiert (Kesper et al., 2007; Review Önel & Renkawitz-Pohl, 2009). Insbesondere führt der Aufbau dieser Adhäsionsstruktur zu einer lokalen Anreicherung von filamentösem Aktin im Zentrum der Transmembranmoleküle (Kesper et al., 2007; Richardson et al., 2007).

2.2.4. Die Rolle des Aktin-Zytoskelettes während der Myogenese in *Drosophila*

Mit Hilfe von *in vivo* Live-Imaging Experimenten konnten Richardson et al. (2008a) zeigen, dass die lokale F-Aktin-Anreicherung der Fusion voranschreitet und es sich hierbei um eine sehr dynamische, kurzlebige Struktur handelt, die innerhalb weniger Minuten ihre maximale Größe von 4,5 µm erreicht.

De novo Aufbau von Aktin-Filamenten wird durch sogenannte Aktin-Nukleatoren eingeleitet. Eine Vielzahl an Studien konnte in den letzten Jahren die Rolle des Aktin-Nukleators Arp2/3 und dessen Regulatoren Wasp und Scar, das *Drosophila* Homolog von Wave, während der Myoblastenfusion belegen (Schäfer et al., 2007; Kim et al., 2007; Massarwa et al., 2007; Richardson et al., 2007; Berger et al., 2008). Der zygotische Verlust von *wasp* oder *scar* führt zu einem schwachen Fusionsdefekt, jedoch ist dieser Fusionsdefekt nach der zusätzlichen Eliminierung der maternalen Komponente von *wasp* bzw. *scar* drastisch verstärkt (Kim et al., 2007; Massarwa et al., 2007; Richardson, et al., 2007).

Das Säuger Wasp Protein liegt normalerweise in einer auto-inhibierten Form vor, in der die Arp2/3 bindende VCA-Domäne maskiert ist. Die Bindung von regulatorischen Proteinen wie Cdc42 oder des Wasp-interacting Proteins Wip führt zur Freisetzung der VCA-Domäne und damit zur Aktivierung von Wasp (Higgs & Pollard, 2001). Während die Funktion von Cdc42 in der Myoblastenfusion nicht endgültig geklärt ist, scheint die Bindung von *Drosophila* Wip, auch als Verprolin 1 (Vrp1) oder Solitary (Sltr) bekannt, eine Rolle in der Aktivierung von Wasp zu spielen (Kim et al., 2007; Berger et al., 2008; Massarwa et al., 2007). Während Wasp in beiden Myoblastenpopulation exipimiert wird, befindet sich Wip spezifisch in FCMs und *wip* mutante Embryonen zeichnen sich durch einen starken Fusionsdefekt aus (Berger et al., 2008; Kim et al., 2007; Massarwa et al., 2007). Lokalisationsstudien und biochemische Interaktionsstudien haben zu dem Modell geführt, dass der Wip/Wasp Komplex über Interaktion mit dem SH2-SH3-Adaptormolekül D-Crk in Abhängigkeit von dem Transmembranmolekül Sns an die Kontaktstellen der FCMs rekrutiert wird und dort die Arp2/3 basierte Aktin Polymerisierung einleitet (Berger et al., 2008; Kim et al., 2007).

Im Gegensatz zu Wasp wird Säuger Wave durch einen Proteinkomplex bestehend aus Sra1/Pir121, Nap1, Abi und HSPC300 in einem inaktivem Zustand gehalten, der durch Bindung von GTP-gebundenem Rac aktiviert wird (Miki & Takenawa, 2003). Erste Hinweise für die Anwesenheit eines vergleichbaren Scar Komplexes in *Drosophila* lieferten Mutanten für *kette*, das *Drosophila* Homolog von Nap1 (Schröter et al., 2004). *Kette* mutante Embryonen zeigen wie maternal und zygotische *scar* Mutanten einen drastischen Fusionsdefekt (Schröter et al., 2004; Gildor et al., 2009). Stimulation der Scar Aktivität erfolgt wahrscheinlich durch die Rac GTPase, da *rac1*, *rac2* Doppelmutanten einen ähnlichen Phänotyp aufweisen (Hakeda-Suzuki, et al., 2002).

Sowohl Kette-Scar als auch Wip-Wasp leiten die F-Aktin-Polymerisierung über die Aktivierung des Arp2/3 Komplexes ein (Abb. 2) (Berger et al., 2008). Genetische Interaktionsstudien, ultrastrukturelle Analysen und GFP-Diffusionsassays deuten darauf hin, dass Scar vermittelte Aktin-Polymerisierung eine Rolle in der initialen Bildung der Fusionsporen spielt, während der Wip-Wasp Komplex für die Weitung der Fusionsporen verantwortlich ist, um die Fusion voranzutreiben (Berger et al., 2008; Gildor et al., 2009). Zudem gibt es Hinweise, dass Querverbindungen zwischen den hier beschriebenen Signalwegen existieren (Önel, 2009).

2.2.5. Die Funktion von kleinen GTPasen und deren Regulatoren

Kleine GTPasen sind Proteine, die über alternierende Bindung des Nukleotids GDP oder GTP als molekulare Schalter in der Regulation vieler zellulärer Ereignisse fungieren. Mitglieder dieser Familie lassen sich aufgrund von Sequenzübereinstimmungen in die folgenden Unterfamilien unterteilen: Arf, Rab, Ran, Ras und Rho GTPasen (Wennerberg et al., 2005). Neben Rho und Cdc42 gehören die Rac GTPasen zur Familie der Rho GTPasen. In *Drosophila* gibt es zwei *rac* Gene, *rac1* und *rac2* und ein *rac*-ähnliches Gen, *mtl* (Hakeda-Suzuki et al., 2001). Überexpressionsanalysen mit konstitutiv-aktiven oder dominant-negativen Rac1, sowie Funktionsverluststudien konnten zeigen, dass Rac1 eine essentielle Funktion während der Myoblastenfusion hat und in funktioneller Redundanz mit Rac2 agiert (Luo et al., 1994; Hakeda-Suzuki et al., 2002). Aktivierung von Rac erfolgt in FCs und FCMs durch den unkonventionellen Guanin-Austauschfaktor (GEF) Myoblast City (*Mbc*), der das *Drosophila* Homolog von Säuger *Dock180* und *C. Elegans* *Ced-5* repräsentiert (Rushton et al., 1995; Erickson et al., 1997; Nolan et al., 1998; Abb. 2). Mitglieder dieser als CDM bezeichneten GEF-Familie liegen gewöhnlicherweise im Komplex mit ELMO/*Ced-12* und Crk/*Ced-2* vor (Meller et al., 2005). Während eine kooperative Wirkung von ELMO bei der direkten Aktivierung von Rac während der Myoblastenfusion demonstriert werden konnte (Geisbrecht et al., 2008), scheint die Interaktion mit *Drosophila* Crk in den Myoblasten nicht für die Lokalisation von *Mbc* benötigt zu werden oder zumindest keine Relevanz in der Myogenese zu haben (Balagoplan et al., 2006). Vielmehr scheint *Mbc* über die Interaktion mit Rolling Pebbles (*Rols*, auch *Antisocial* genannt) in den FCs an die Kontaktstellen der Myoblasten rekrutiert zu werden (Chen et al., 2001), jedoch ist die Lokalisation von *Mbc* in FCMs ungeklärt.

Eine weiterer Faktor, der vermutlich über die Rac-GTPase wirkt, ist der GEF Schizo (auch als *Loner* bekannt; Chen et al., 2003; Abb. 2). Der Verlust von *schizo* resultiert in einem drastischen Fusionsdefekt, der mit dem Fusionsphänotyp von *duf*, *rst* Doppelmutanten vergleichbar ist (Chen et al., 2003). Die Anwesenheit von gerichteten Filopodien suggeriert jedoch, dass die initiale Erkennung und Adhäsion zwischen FCs und FCMs nicht beeinflusst ist. Schizo besteht aus einer N-terminalen lokalisierten IQ-Domäne, welche die Bindung des Ca^{2+} -bindenden Proteins Calmodulin vermitteln kann (Rhoads & Friedberg, 1997), sowie einer Sec7-Domäne mit einer angrenzenden Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne (Abb. 5A; Chen et al., 2003; Önel et al., 2004). Sec7-Domänen katalysieren den GDP/GTP-Austausch an GTPasen der Familie der ADP-Ribosylierungsfaktoren (Arf) (Jackson & Casanova, 2000). Die PH-Domäne kann dabei über die Konzentrierung von GEF und Arf GTPase an Phospho-Inositide reiche Membranen die katalytische Aktivität des GEFs verstärken (Chardin et al., 1996; Paris et al., 1997; Macia et al., 2008). Die humanen Homologe von Schizo gehören zur BRAG Unterfamilie und sind vornehmlich in der Aktivierung von Arf6 involviert (Someya et al., 2001). Aufgrund von *in vitro* Freisetzungsstudien und Überexpressionsanalysen mit der GDP-gebundenen Form von D-Arf6 wurde postuliert, dass Schizo als ein GEF für Arf6 fungiert (Chen et al., 2003). Die *in vivo* Funktion von Schizo in der Aktivierung von D-Arf6 ist jedoch nicht klar, da der Verlust von

maternalem und zygotischem D-Arf6 keinen offensichtlichen Muskelphänotyp bewirkt (Dyer et al., 2007). Dies kann einerseits bedeuten, dass D-Arf6 in funktionieller Redundanz mit einem anderen Arf Protein wirkt, wie es bereits für die Rac GTPasen gezeigt wurde (Hakeda-Suzuki et al., 2002), oder dass D-Arf6 nicht das Ziel ist und Schizo in einem anderem Signalweg integriert ist. Dieser Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen.

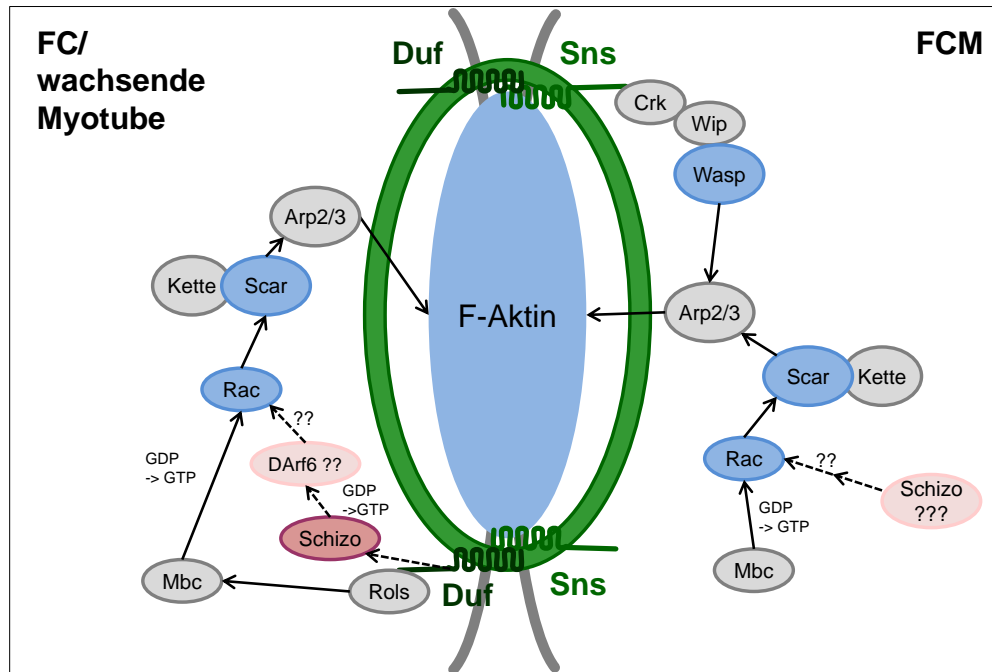


Abb. 2 Vereinfachtes Modell einiger Faktoren, die in der Myoblastenfusion involviert sind

Gezeigt sind zwei sich kontaktierende Myoblasten, links die Founderzelle (FC) oder nach Fusion der wachsende Muskel bzw. rechts die Fusionskompetente Myoblaste (FCM). Die Kontakt-vermittelnden Ig-Transmembranmoleküle Duf und Sns sind in grün dargestellt, wobei der Kreis die ringförmige Anordnung der Rezeptoren an der Kontaktstelle (FuRMAS) repräsentieren soll. Die Ig-Rezeptoren Rst und Hbs sind der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet. Lokale F-Aktin Anreicherung innerhalb der FuRMAS ist durch einen hellblauen Kreis gekennzeichnet. Schwarze Pfeile bedeuten in der Myoblastenfusion nachgewiesene, direkte Interaktionen, gestrichelte Pfeile zeigen indirekte oder nicht eindeutige Interaktionen an. Die in dieser Arbeit relevanten Faktoren sind farbig hervorgehoben. Die unterschiedlichen Farben von Schizo reflektieren unterschiedliche Expressionsdaten von Schizo: nur in FCs (Chen et al., 2003) oder in FCs und FCMs (Richardson et al., 2007). Die postulierte Rolle von D-Arf6 ist nicht bewiesen, da Funktionsverlustmutanten keinen Fusionsphänotyp aufweisen (Dyer et al., 2007).

2.3. Die Familie der ADP-Ribosylierungsfaktoren (Arf)

Arf-GTPasen sind kleine Ras-ähnliche, GTP-bindende Proteine mit einem ungefähren Molekulargewicht von ca. 21 kDa, die sich durch die folgenden strukturellen Merkmale auszeichnen (Donaldson & Jackson, 2000; Gillingham & Munro, 2007). Erstens haben alle Arf-Proteine eine amphipatische Helix am N-terminalen Ende des Proteins gemeinsam, die durch eine Myristoylierung am Glycin an Position 2 weiter modifiziert wird. Das zweite für Arf-Proteine kennzeichnende Merkmal sind die Switch I und Switch II Regionen, die durch eine mobile Interswitch-Region getrennt werden. GTP-Bindung an konservierte Module bewirkt einerseits eine Konformationsänderung der Switch I und II Regionen, so dass spezifische Effektorproteine rekrutiert werden können und andererseits eine Rotation der Interswitch Region, die die Freisetzung der N-terminalen Helix und somit eine Membranlokalisierung ermöglicht (Antonny et al., 1997).

In Säugern gibt es 6 Vertreter der Arf-Familie, die basierend auf ihrer Primärstruktur in drei Klassen unterteilt werden: Arf1, 2 und 3 bilden Klasse I, Arf4 und 5 gehören zu Klasse II, während Arf6 das am meisten abweichende Klasse III Arf Protein darstellt (Gillingham & Munro, 2007). Arf6 zyklisiert in Abhängigkeit von dem GTP-gebundenen Zustand zwischen der Plasmamembran und einigen Endosomen, wobei es hauptsächlich Endozytose oder die Umorganisation des kortikalen Aktin-Zytoskeletts kontrolliert (Donaldson, 2003; D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). Im Gegensatz befindet sich Arf1 konzentriert um den Golgi, wo es in der Rekrutierung von Coat-Proteinen und der Cargo-Freisetzung als kritischer Regulator des Cargo-Transportes vom Golgi zu der Plasmamembran und dem endosomalen System fungiert (Spang, 2002; Donaldson, 2005). Alternativ spielt Arf1 eine Rolle in endosomalen Kompartimenten (Kumari et al., 2008). Klasse II Arf Proteine lokalisieren am Golgi, wo sie in partieller Redundanz mit Arf1 wirken (Volpicelli-Daley et al., 2005).

In *Drosophila* gibt es drei Arf-Gene *d-arf6* (*arf51F* in Flybase), *d-arf1* (*arf79F* in Flybase) und *d-arf2* (*arf102F* in Flybase), sowie mehrere Arf-ähnliche Gene (Abb. 3; Abb. 5; Gillingham & Munro, 2007). Interessanterweise repräsentiert jedes *Drosophila* Arf-Protein ein Mitglied der aus Säugetieren bekannten Familien: D-Arf1 weist Homologien zu Klasse I auf (96% Homologie zu Arf1), D-Arf2 repräsentiert Klasse II (85 % Homologie zu Arf4), während D-Arf6 das Klasse III Arf6 vertritt (97 % Homologie auf Aminosäureebene) (Abb. 3, Abb. 5Abb. 5C). Neben der postulierten Rolle in der Myoblastenfusion, spielt D-Arf6 eine Rolle in der Slit-Endozytose während der Ausbildung der Kommisuren (Önel et al., 2004), sowie im Recycling von endosomalen Membranen in der Zytokinese von Spermatozyten (Dyer et al., 2007). Für D-Arf1 konnte indirekt eine Rolle in dem apikalen Membrantransport während der Rhabdomer-Biogenese bei der Augenentwicklung zugeordnet werden (Raghu et al., 2009), jedoch existieren weder für D-Arf1 noch für D-Arf2 phänotypische Analysen, die auf dem Funktionsverlust von D-Arf1 oder D-Arf2 beruhen.

Majority		MGNTFSXLFKRLFGKKEMRIIMVGLDAAGKTILYKLKLGETVTITPTIGFNVETVEYKNISFTVDVGGQOKIRPLWRHYFQNTQGLIFVVDSDNRERI																			
		10 20 30 40 50 60 70 80 90 100																			
Klasse I	dm arf79F.pro	..V.AN..KG.....																		
	mmARF1.pro	..I.AN..KG.....																		
	mmARF2.pro	..V.EK..KS.....																		
	mmARF3.pro	..I.GN..LKS.I.....																		
Klasse II	dm arf102F.pro	..L.I.S..LT.....Q.....									C.....D.....									
	mmARF4.pro	..L.I.S..S.....Q.....									C.....									
	mmARF5.pro	..L.V.A..S.I.....Q.....									C.....V.....									
Klasse III	dm arf51F.pro	---K.LSKI..N.....L.....										...QS...V...T...VK.N...Y...CA...D...96									
	mmARF6.pro	---KVLSKI..N.....L.....										...QS...V...T...VK.N...Y...CA...D...96									
Majority		NEAREELXRMLAEDELRAVLLVFANKQDLPNAMNAEITDKLGLHSLRNRYIQTATCATSGDGLYEGLDWLSNQLKN-KK																			
		110 120 130 140 150 160 170 180																			
	dm arf79F.pro	G...M.....I.....									ANR.....182									
	mmARF1.pro	M...M.....R...Q.....									R...Q.....181									
	mmARF2.pro	T...T.....V.....Q.....									Q.....181									
	mmARF3.pro	T...M.....H.....A.....									A.....181									
	dm arf102F.pro	T..ER..QN..Q.....T...L...R.NQ...H.F..S...Q.H.....AE.--A..									180									
	mmARF4.pro	Q.GAAV.QK..L...Q.....L.....AIS..M.....Q...T...V...Q.T.....E.--S..R									180									
	mmARF5.pro	Q.SAD..QK..Q.....M.....PVS..L.....QH..S.T..V...Q.T...D.....HE.--S..R									180									
	dm arf51F.pro	D...T..H.IINDR..M...II..I.....D..KPH...QE...TRI..D...V.PS...S...I..TSNH..L									175									
	mmARF6.pro	D...Q..H.IINDR..M...II..I.....D..KPH...QE...TRI..D...V.PS...T...TSNY..S									175									

Abb. 3 Es gibt drei konservierte Arf-GTPasen in *Drosophila*

Aminosäuresequenzvergleich der *Drosophila* Arf-GTPasen D-Arf6 (Arf51F), D-Arf1 (Arf79F) und D-Arf2 (Arf102F) gegen die Arf-GTPasen Arf1-6 der Maus (Konservierte Reste als Punkte dargestellt). Funktionelle Regionen, wie die Switch I und II-Region (blaue Kästchen), sowie die Interswitch-Region (oranger Kasten) bilden dabei besonders stark konservierte Bereiche. Die N-terminale Helix ist grün unterstrichen. Rote Kästchen zeigen konservierte GTP-bindende Motive. Rote Pfeile zeigen die für den GDP/GTP-Austausch essentiellen Aminosäuren Threonin T und Glutaminsäure Q. Der Austausch von T->N verhindert GTP-Bindung und führt zu einer inaktiven Arf-GTPase, während die Q->L Substitution die GTP-Hydrolyse beeinflusst und somit in einer konstitutiv GTP-gebundener, aktiver Arf-GTPase resultiert. (mm *mus musculus* ARF1-6, dm *drosophila melanogaster*).

2.4. Die Regulation der Arf-GTPasen erfolgt durch Arf-GEFs und Arf-GAPs

Die koordinierte Aktivität der Arf Proteine benötigt azessorische Proteine, welche die Bindung von GDP bzw. GTP regulieren. GDP/GTP-Austausch und damit Aktivierung wird durch Arf-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (Arf-GEF) katalysiert (Abb. 5B). Wie die meisten G-Proteine binden Arf Proteine GTP mit starker Affinität, weisen jedoch im Gegensatz zu anderen GTPasen der Ras Superfamilie eine niedrige intrinsche Hydrolyse-Aktivität auf, so dass die Funktion von Arf-GTPase aktivierende Proteine (Arf-GAPs, Abb. 5Abb. 5B) unabdingbar ist (Kahn & Gilman, 1986).

2.4.1. Arf-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (Arf-GEFs)

Arf-GEF Proteine sind durch die Anwesenheit einer zentral gelegenen, ca. 200 AS großen Sec7-Domäne charakterisiert, welche *in vitro* ausreichend ist, um den Austausch von GDP zu GTP zu katalysieren (Chardin et al., 1996). Sec7-Domänen vermitteln den GDP/GTP Austausch, in dem sie über eine hydrophobe Furche mit der Switch I und II Region des Arf Proteins interagieren und durch einen konservierten, invarianten Glutamatfinger den β -Phosphat Rest des gebundenen GDPs destabilisieren (Goldberg et al., 1998; Beraud-Dufour et al., 1998; Mossesova et al., 1998; Renault et al., 2003). Nach der Dissoziation des GDPs kann das Nukleotid-freie Arf zytosolisch vorhandenes GTP binden, so dass infolge das Arf-GTP von dem Arf-GEF freigesetzt werden kann. Aufgrund ihrer Domänenstruktur können die Sec7-GEFs in die folgenden hoch konservierten Familien klassifiziert werden (Donaldson & Jackson, 2000; Casanova, 2007; Gillingham & Munro, 2007). Die hoch molekular-gewichtigen Arf-GEFs der GBF/GNOM/Gea- oder der BIG/Sec7- Unterfamilien

funktionieren primär in dem ER-Golgi System, während die niedriger molekular-gewichtigen Arf-GEFs der ARNO/Cytohesin/Grp, der PSD/EFA6, der BRAG/IQ-Sec oder der FBX8-Unterfamilie hauptsächlich im Endosomal-Plasmamembran-System wirken. Die Vielzahl der Sec7-GEFs und der Arf-GTPasen wirft die Frage auf, mit welcher Substratspezifität die Aktivierung der verschiedenen Arf-GTPasen erfolgt. Arf-GEF Proteine der EFA6 Unterfamilie aktivieren z. B. Arf6 *in vitro* und *in vivo* effizienter als Klasse I und II Arf Proteine (Franco et al., 1999). Im Gegensatz katalysieren Mitglieder der ARNO/Cytohesin/Grp *in vitro* am effizientesten den GDP/GTP-Austausch an Klasse I Arf Proteinen, kolokalisieren *in vivo* jedoch vornehmlich mit Arf6 (Chardin et al., 1996; Frank et al., 1998; Langille et al., 1999; Macia et al., 2001; Santy et al., 2001; Cohen et al., 2007). Eine bisher recht ungeklärte Frage ist, wie die Substratspezifität gewährleistet wird. Strukturanalysen könnten darauf hindeuten, dass die Sec7-Domäne selber eine Rolle in der Substratpräferenz spielt (Cox et al., 2004). Während die meisten Arf-GEFs *in vitro* jedoch zu einem variablen Ausmaß nahezu alle Arf Proteine aktivieren können, werden Arf-GEF Proteine *in vivo* zu spezialisierten Membrankompartimenten rekrutiert, wo sie auf spezifische Arf Proteine treffen. Funktionelle Studien indizieren, dass flankierende Sequenzen in diesem Prozess involviert sind (Pacheco-Rodriguez et al., 1998).

2.4.2. Arf-GTPase aktivierende Proteine (Arf-GAPs)

Arf-GAPs katalysieren die Hydrolyse des gebundenen GTPs und fungieren somit in der Inaktivierung des Arf Proteins. Die charakteristische Arf-GAP Domäne ist ungefähr 140 AS groß und zeichnet sich durch eine invariante C-X₂-CX₁₆₋₁₇-C-X₂-C-X₄-R Motif aus. Dabei übernimmt das zentrale Zink-Ion eine strukturelle Funktion, während einem weiteren invarianten Argininrest eine katalytische Funktion in der Hydrolyse zugeschrieben wird (Goldberg et al., 1999; Mandiyan et al., 1999). Alle Arf-GAPs haben zusätzlich zu der katalytischen Domäne weitere funktionelle Domänen, welche mit einer Vielzahl von Signalmolekülen und Adaptorproteinen interagieren können (Randazzo & Hirsch, 2004; Inoue & Randazzo, 2007). In Säugern existieren 24 Arf-GAPs, die aufgrund ihrer Domänenstruktur in 10 Familien unterteilt werden können (Reviews: Gillingham & Munro, 2007; Inoue & Randazzo, 2007; Abb. 4Abb. 4). Die am einfachsten aufgebauten Arf-GAPs der Arf-GAP1/2/3 und der SMAP Unterfamilie besitzen lediglich die N-terminale Arf-GAP Domäne und kleinere Lipid- und Clathrin-bindende Motive und wirken hauptsächlich im Aufbau der Coat-Proteine im Vesikeltransport bzw. im endosomalen Transport. Ein weit komplexere Struktur weisen Arf-GAPs der AZAP-Typ-Unterfamilien auf, in denen die Arf-GAP Domäne durch Ankyrin-Wiederholungen und eine PH Domäne umfasst ist, die einzelnen Mitglieder durch weitere individuellen Domänen charakterisiert sind. Diese Arf-GAPs regulieren eine Vielzahl an zellulären Prozesse, wie z.B. Vesikelabschnürung und -transport, Zellmigration und -ausbreitung, Organisation von fokalen Adhäsionsstrukturen, Tumor-Invasion und Endozytose (Reviews: Nie & Randazzo, 2006; Inoue & Randazzo, 2007; Randazzo et al., 2007). Mitglieder der Git-Unterfamilie, Git1 (Cat1/p95APP1) und Git2 (Pkl/Cat2/p95APP2), besitzen drei Ankyrin Wiederholungen, eine Spa-Homologie Domäne, eine

Coiled-Coil-Domäne sowie eine C-terminal gelegene Paxillin-Bindestelle und agieren als Regulatoren des Zytoskeletts während der Zellmigration und der Dynamik der fokalen Adhäsionsstrukturen (Hoefen & Berk, 2009). Obwohl sie keine Spezifität für eine bestimmte Arf GTPase *in vitro* zeigen (Vitale et al., 2000), wirken sie *in vivo* hauptsächlich als negative Regulatoren für Arf6 (Albertinazzi, et al. 2003; Miura et al., 2009).

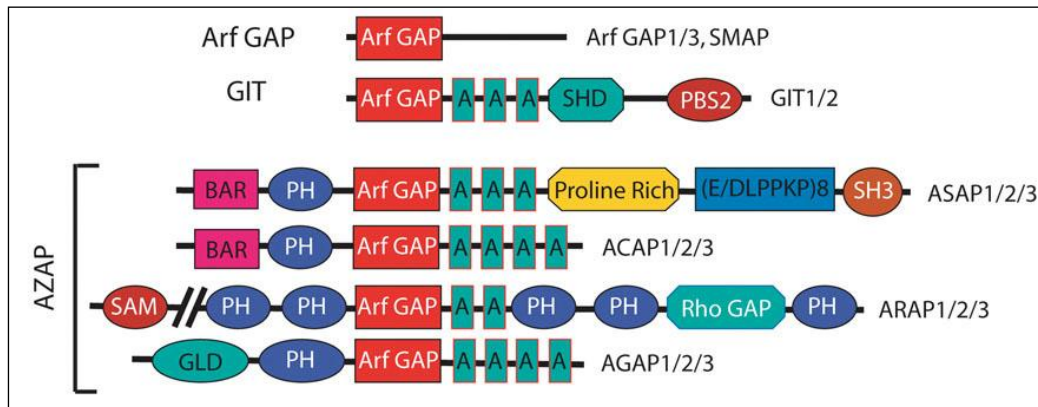


Abb. 4 Schematische Darstellung der Vertebraten Arf-GAPs

Arf-GAPs der ArfGAP1/3 bzw. SMAP Unterfamilie sind sehr einfach aufgebaut. Arf-GAPs der Git1/2 Unterfamilie sind durch die zusätzlichen Ankyrin-Wiederholungen (A), der Spa-Homologie-Domäne (SHD), sowie einer Paxillin-Bindestelle (PBS) charakterisiert. AZAP-Typ Arf-GAPs haben Ankyrin-Wiederholungen (A) sowie ein PH-Domäne (PH) gemeinsam, unterscheiden sich jedoch durch weitere Domänen:

BAR = Bar-Domäne; GLD = GTP-Bindeprotein-ähnliche Domäne; SAM, sterile α -motif ; SH3 = Src-Homologie 3-Domäne (Abb. aus Randazzo et al., 2007)

2.5. Zielstellung

Der Arf-GEF Schizo hat eine essentielle Funktion bei der Myoblastenfusion von *Drosophila melanogaster* (Chen et al., 2003). Über die Expression von Schizo in den Myoblasten existieren unterschiedliche Aussagen: entweder in exklusiv in FCs (Chen et al., 2003) oder in beiden Myoblasten (Richardson et al., 2007) (Abb. 2). Aus diesem Grund sollte zunächst aufgeklärt werden, in welchen Myoblastenpopulationen Schizo benötigt wird. Die Tatsache, dass der Verlust von D-Arf6 keine Fusionsdefekte hervorruft (Dyer et al., 2007), wirft die zentrale Frage der Substratspezifität des Arf-GEFs Schizo in der Myoblastenfusion auf. Die Funktion von Schizo in der Aktivierung der *Drosophila* Arf Proteine D-Arf1, D-Arf2 und/oder D-Arf6, sowie die Rolle der Arf GTPasen in der Myogenese sollte daher hauptsächlich durch *in vivo*, aber auch durch *in vitro* Studien untersucht werden. Zudem sollte aufgeklärt werden, ob Schizo über die Lokalisation der Rac GTPase tatsächlich in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts involviert ist. Dies wurde vornehmlich durch genetische Interaktionstests und Rettungsexperimente untersucht.

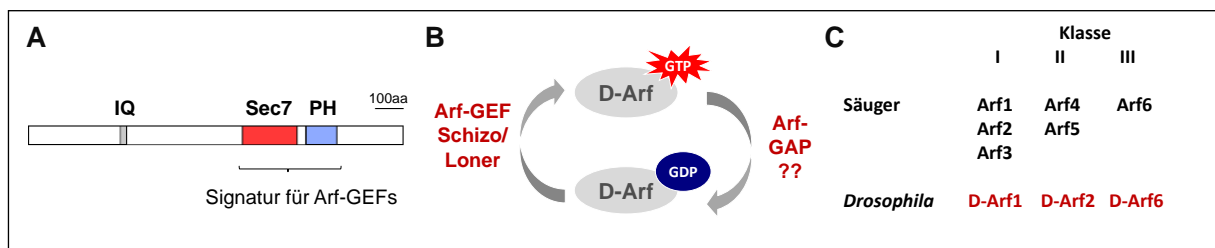


Abb. 5 Der Arf-GEF Schizo und Arf GTPasen in *Drosophila*

A) Domänenstruktur von Schizo: IQ-Domäne, katalytische Sec7-Domäne und Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne. **B)** Der Arf-GEF Schizo ist über die Katalyse des GDP/GTP-Austausches in der Aktivierung der Arf GTPasen involviert. Inaktivierung erfolgt durch Arf-GTPase aktivierende Proteine (Arf-GAPs). **C)** In *Drosophila* existieren drei Arf GTPasen, die jeweils ein Mitglied der aus Säugern bekannten Klassen repräsentieren.

Die Tatsache, dass Arf Proteine eine nur sehr geringe intrinsische GTPase Aktivität aufweisen, fordert die Anwesenheit eines katalytischen Arf-GAP Proteins in den Myoblasten (Abb. 5C). Zu Beginn dieser Arbeit existierten jedoch keine *in vivo* Daten über Arf-GAP Proteine in *Drosophila*. Durch Analysen des mRNA-Verteilungsmusters putativer Arf-GAP kodierender Gene konnte das *Drosophila* Homolog des Vertebraten Git, D-Git, als mesoderm spezifisch exprimierter Arf-GAP identifiziert werden. Die Generierung einer *d-git* Mutante und die anschließende phänotypische und funktionelle Analyse sollte Aufschluss über die Funktion von D-Git in der Muskelentwicklung geben. Insbesondere sollte auf die Rolle des Arf-GAPs D-Git in der Inaktivierung der Arf GTPasen und die Analyse konservierter Interaktionspartner fokussiert werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakterisierung des *schizo* Allels *schizo*^{CI-28}

3.1.1. Einführung in bekannte *schizo* Allele

Mutanten für *schizo* wurden in zwei unabhängig durchgeführten EMS-Mutagenese Screens isoliert. Die beiden Allele *schizo*^{CI-28} und *schizo*^{U112} wurden bei der Suche nach Genen, die in der kommissuralen Musterbildung während der Entwicklung des Zentralen Nervensystem (ZNS) von *Drosophila* involviert sind, identifiziert (Hummel et al., 1998; Önel, et al., 2004). In einem ähnlichen Zeitraum wurden die beiden Allele *loner*^{T1032} und *loner*^{T1510} anhand ihres Defektes in der Myoblastenfusion entdeckt (Chen et al., 2003). Komplementationsanalysen haben ergeben, dass *schizo*^{CI-28}, *schizo*^{U112}, *loner*^{T1032} und *loner*^{T1510} allelisch zueinander sind und es sich daher in der Tat um Mutanten des gleichen Genes handelt (Önel et al., 2004). Während *schizo*^{CI-28} und *schizo*^{U112} Mutanten sowohl Defekte in der Ausbildung der Kommissuren als auch in der Myoblastenfusion aufweisen (Önel et al., 2004; Abb. 8), zeigen *loner*^{T1510} mutante Embryonen keine Störungen in dem ZNS (persönliche Mitteilung S. Önel). Die gleichen Phänotypen können auch bei Betrachtung der verschiedenen *schizo/loner* Allele in Transheterozygose zu der Defizienz *Df(3L)ME178*, welche die genomische Region von *schizo* deletiert, beobachtet werden (siehe Tabelle 1). Die *schizo* Allele *loner*^{T1032} bzw. *loner*^{T1510} sind durch die Anwesenheit eines Stopkodons in dem dritten Exon charakterisiert, welches zu dem Verlust der funktionellen Sec7- und der PH-Domäne führt. Zumindest für das *loner*^{T1510} Allel konnte die Mutation bestätigt werden. Um die phänotypischen Diskrepanzen zwischen den *schizo* Allelen aufzuklären, sollte das in dieser Arbeit verwendete *schizo* Allel *schizo*^{CI-28} molekular charakterisiert werden.

Tabelle 1 Übersicht über bekannte Phänotypen der verschiedenen *schizo* Allele

Allel	ZNS-Phänotyp	Fusionsdefekt
<i>schizo</i> ^{CI-28}	Ja (Önel et al., 2004)	Ja (Siehe XXX)
<i>Df(3L)ME178</i>	Ja (Önel et al., 2004)	Ja (S.Önel)
<i>schizo</i> ^{CI-28} / <i>Df(3L)ME178</i>	Ja (Önel et al., 2004)	Ja (S.Önel)
<i>loner</i> ^{T1510}	Nein (S.Önel)	Ja (Chen et al., 2003)
<i>loner</i> ^{T1510} / <i>Df(3L)ME178</i>	Nein (S.Önel)	Ja (S.Önel)

3.1.2. Das Allel *schizo*^{CI-28} weist keine Mutation im kodierenden Bereich von *schizo* auf

An dieser Stelle soll zunächst ein kurzer Überblick über die genomische Region von *schizo* gegeben werden, die sich über 41 kb erstreckt (siehe Abb. 6). Das Gen *schizo* beinhaltet 6 Exons und 5 Introns und kodiert für mindestens zwei Isoformen, SchizoP1 und SchizoP2, die sich jeweils im ersten Exon und einer Isoform spezifischen 5'UTR unterscheiden und für Proteine von 1325 bzw. 1313 Aminosäuren kodieren. Beide Isoformen sind in der Lage, den *schizo* mutanten Fusions- und den

ZNS-Defekt zu retten, was zeigt, dass beide Isoformen funktionell sind (Chen et al., 2003; Önel et al., 2004). In Datenbanken werden zudem zwei weitere kürzere Isoformen, SchizoP3 mit 1210 Aminosäuren und SchizoP4 mit 1220 Aminosäuren, vorgeschlagen (Chen et al., 2003; Flybase Release.5.1), die ebenfalls durch eine spezifische 5'UTR und einem spezifischen ersten Exon charakterisiert sind. Es ist jedoch nicht bewiesen, dass diese Isoformen *in vivo* tatsächlich transkribiert werden. Alle Isoformen von *schizo* nutzen eine gemeinsame 3'UTR.

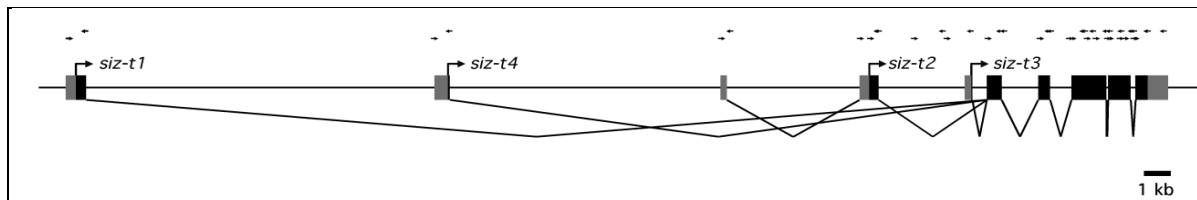


Abb. 6 Genomische Region von *schizo*

Die genomische Region von *schizo* umfasst über 40 kb und weist eine komplexe Exon/Intron Struktur auf. Für *schizo* (*siz*) sind verschiedene Transkripte annotiert: *siz-t1* mit 5126 bp, *siz-t2* mit 5314 bp, *siz-t3* mit 4654 bp und *siz-t4* mit 4931 bp, welche für die Isoformen SchizoP1, SchizoP2, SchizoP3 und SchizoP4 kodieren. Die tatsächliche Existenz eines Transkriptes für *siz-t3* und *siz-t4* wurde experimentell bisher noch nicht bewiesen. Jede Isoform verfügt über eine spezifische 5'UTR und über ein spezifisches erstes Exon, während Exon 2 bis Exon 6, sowie die 3'UTR gemeinsam genutzt werden. Die kleinen Pfeile geben die für die Sequenzierung des *schizo*^{CI-28} Allels benutzten Primer wieder.

Um das Allel *schizo*^{CI-28} molekular zu analysieren, wurden relevante Bereiche der genomischen Region von *schizo* an homozygoten *schizo*^{CI-28} Mutanten sequenziert und hinsichtlich Basenaustausche in den Protein-kodierenden Regionen, in den untranslatierten Regionen (UTRs) und den putativen Spleißerkennungsstellen geprüft. Um sicherzustellen, dass es sich bei den identifizierten Basenaustauschen nicht um einen Polymorphismus des mutagenisierten Stammes handelt, wurde *schizo* ebenfalls an homozygoten *wasp* Mutanten sequenziert, die aus derselben EMS Mutagenese stammen und daher die gleichen DNA-Polymorphismen aufweisen sollten. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden in Tabelle 2 erfasst. Es konnte jedoch kein Basenaustausch im Protein-kodierenden Bereich oder in putativen Spleiß-Erkennungsstellen identifiziert werden, die zu einem Stop-Codon oder zu einer Verschiebung des Leserahmens führen und spezifisch für *schizo*^{CI-28} ist.

3.1.3. In *schizo*^{CI-28} mutanten Embryonen findet Transkription der *schizo* mRNA statt

Die Tatsache, dass in *schizo*^{CI-28} Mutanten weder entscheidende Basenaustausche in der Protein-kodierenden Sequenz, die zu einem vorzeitigen Stopkodon oder einer Verschiebung des Leserahmens führen, noch in den Spleiß-Erkennungssequenzen identifiziert werden konnten, kann auf einem Defekt in der Expressionsregulation hindeuten. Um zu analysieren, ob die Transkription in *schizo*^{CI-28} Mutanten reduziert oder verhindert ist, wurden *in situ*-Hybridisierungen mit einer *schizo* spezifischen RNA-Sonde an *schizo*^{CI-28} mutanten Embryonen durchgeführt. Im wildtypischen Embryo findet man bis Stadium 7 zunächst eine eher ubiquitäre Verteilung des *schizo* Transkripts, welche sich während der weiteren embryonalen Entwicklung auf das somatische und viszerale Mesoderm, als auch auf das

ZNS beschränkt (Chen et al., 2003; Önel et al., 2004; Abb. 7 A, D). In homozygoten *schizo*^{CI-28} mutanten Embryonen konnte eine zu den Kontrollembryonen vergleichbare mRNA Verteilung festgestellt werden. Insbesondere konnte während den fusionsrelevanten Stadien 11-14 *schizo* mRNA im somatischen Mesoderm und dem ZNS detektiert werden (Abb. 7 C und E). In *Drosophila* werden dem Embryo viele mRNAs zusätzlich zu der zygotischen mRNA Transkription bereits maternal zur Verfügung gestellt, so dass die frühe Embryonalentwicklung gewährleistet ist. Auch *schizo* verfügt über eine solche maternale Komponente (Chen et al., 2003; Önel et al., 2004). Um herauszufinden, wie lange die maternale Komponente von *schizo* detektierbar ist, wurden *in situ*-Hybridisierungen an der Deletion *Df(3L)ME178* durchgeführt, in der unter anderem *schizo* deletiert ist und somit keine zygotische Transkription der *schizo* mRNA stattfindet. In homozygot defizienten Embryonen konnte während den fusionsrelevanten Stadien nahezu keine mRNA mehr detektiert werden (Abb. 7 B und E). Somit kann die in homozygoten *schizo*^{CI-28} Embryonen beobachtete mRNA Verteilung nicht auf eine maternal bereitgestellte mRNA zurückzuführen sein.

Tabelle 2 Übersicht über die Sequenzierung von *schizo*^{CI-28}

Genomische Region: Intron/Exon	Basenaustausch in <i>schizo</i> ^{CI-28}	Mögliche Konsequenz	Austausch in <i>wasp</i> ^{3D3-035}
5' UTR von <i>siz-t1</i>	Deletion von 1T	?	Nein
	Deletion von 11 Basen	?	Ja
	T -> A	?	Nein
<i>siz-t1</i> spezifisches Exon	A -> G	I34M	Ja
Splice-Donor-Stellen	T -> A	?	Ja
5' UTR von <i>siz-t2</i>	A -> T	?	Ja
	G -> A	?	Ja
	G -> A	?	Ja
	A -> T	?	Ja
	G -> A	?	Ja
<i>siz-t2</i> spezifisches Exon	Nein		
Spleiß-Donor-Stellen	Nein		
5' UTR von <i>siz-t3</i>	2 zusätzliche C	?	Ja
<i>siz-t3</i> spezifisches Exon	Nein		
Spleiß-Donor-Stellen	Nein		
5' UTR von <i>siz-t4</i>	Nein		
<i>siz-t4</i> spezifisches Exon	Nein		
Spleiß-Donor-Stellen	Nein		
Spleiß-Akzeptor-Stellen	6xT -> 7xT (Pyrimidin reiche Region)	Spleiß-Defekte?	Ja
Exon 2	CAA -> CAG	Keine AS-Austausch	Ja
Spleiß-Donor-Stellen	Nein		
Spleiß-Akzeptor-Stellen	A -> T (Branch-Site?)	Spleiß-Defekte?	Ja
Exon 3	Nein		
Spleiß-Donor-Stellen	Nein		
Spleiß-Akzeptor-Stellen	Nein		
Exon 4	C -> A	Keine AS-Austausch	
	T -> C	Keine AS-Austausch	
	G -> A	Keine AS-Austausch	
Spleiß-Donor-Stellen	Nein		
Spleiß-Akzeptor-Stellen	Nein		
Exon 5	Nein		
Spleiß-Donor-Stellen	Nein		
Spleiß-Akzeptor-Stellen	Nein		
Exon 6	Nein		
3' UTR	Nein		

Sequenzierung der kodierenden Regionen von *schizo* (Exon 1-6), der 5' und 3' Nicht-translatierten Regionen (UTR), sowie putativer Spleißerkennungsstellen (5'-Spleiß-Donor-Stellen (GUA/GAGU), 3'-Spleiß-Akzeptor-Stelle (Polypyrimidin-reiche Sequenz, AG); Branch-Punkt-Stelle (A)). Mehrfach bestätigte (n>3) Basenaustausche sowie die mögliche Konsequenzen sind angegeben. Gleicher Austausch in *wasp*^{3D3-035} mutanten Embryonen deutet auf eine DNA-Polymorphismus des mutagenisierten Stammes hin.

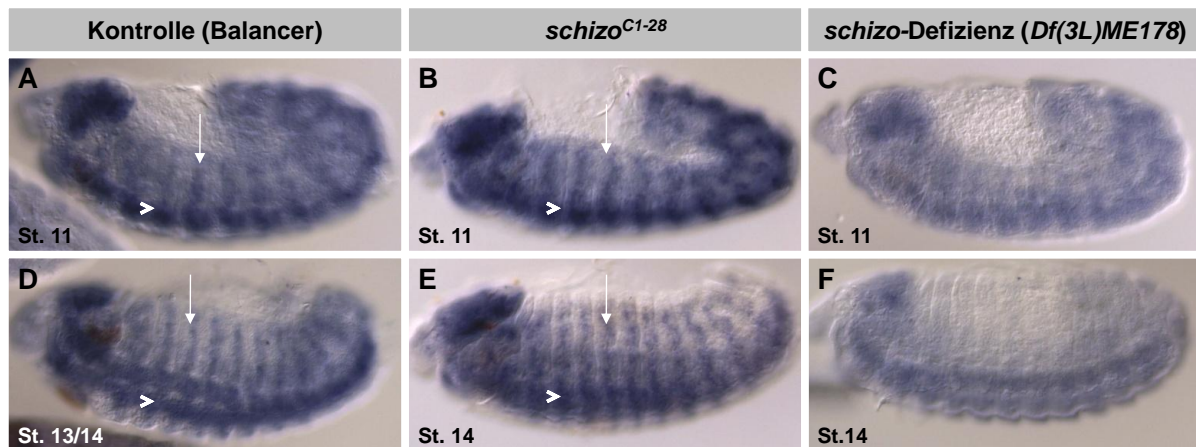


Abb. 7 *schizo*^{C1-28} mutante Embryonen zeigen eine wildtypische *schizo* mRNA Verteilung

In situ-Hybridisierungen an *whole-mount* Embryonen mit einer *schizo* spezifischen RNA-Sonde. Anterior ist links, dorsal ist oben. In homozygoten *schizo*^{C1-28} mutanten Embryonen (B, E) ist die *schizo* mRNA während der fusionsrelevanten Stadien im somatischen Mesoderm (Pfeil) und im ZNS (Pfeilkopf) nachweisbar und ähnelt dem *schizo* mRNA Verteilungsmuster der Kontroll-Embryonen (A, D). In Embryonen, in denen *schizo* deletiert ist, (*Df(3L)ME178* C, F), ist im Mesoderm in fusionsrelevanten Stadien nahezu keine maternal bereitgestellte mRNA nachweisbar.

3.1.4. *schizo*^{C1-28} Mutanten zeigen einen drastischen Fusionsdefekt

Um die Entwicklung der embryonalen Muskulatur in *Drosophila* zu untersuchen, wurde die Muskulatur mittels einer anti- β -Tubulin Antikörperfärbung angefärbt. β -Tubulin ist die muskelspezifische Tubulin Variante, die sowohl in unfusionierten Myoblasten als auch in den mehrkernigen Muskeln exprimiert wird (Buttgereit et al., 1996). In einem wildtypischen Embryo ist die Fusion der Myoblasten in einem Stadium 15/16 Embryo nahezu abgeschlossen und die mehrkernigen Muskeln adhärieren in charakteristischer Anordnung an die epidermalen Anheftungsstellen (Abb. 8). Im Gegensatz sind in *schizo*^{C1-28} mutanten Embryonen unzählige unfusionierte Myoblasten zu beobachten (Abb. 8 Abb. 8B und C). β -Tubulin-Antikörperfärbungen an P(rP298-LacZ) tragenden-Embryonen, welche β -Galaktosidase in den Kernen der FCs exprimieren (Nose et al., 1998), lassen zudem erkennen, dass in *schizo*^{C1-28} Mutanten unfusionierte FCMs Filopodien in Richtung der FCs ausstrecken (Abb. 8C, Pfeil). Weiterhin ist zu beobachten, dass sich FCMs um die FCs herum ansammeln und an diese adhärieren (Abb. 8C, Doppelpfeil), während die FCs in Richtung der Anheftungsstellen elongieren. Diese Daten weisen darauf hin, dass die initiale Erkennung und Adhäsion zwischen FCs und FCMs in *schizo*^{C1-28} mutanten Embryonen nicht gestört ist, wie es bereits auch für die *loner*^{T1510} und *loner*^{T1032} Allele beschrieben wurde (Chen et al., 2003). In *Drosophila* läuft die Myoblastenfusion in zwei Fusionsphasen ab, wobei während der ersten Fusionsphase ein zwei- bis dreikerniger Muskelvorläufer gebildet wird (Bate et al., 1990; Rau et al., 2001). Für Schizo wird eine Rolle während der ersten Fusionsphase angenommen (Chen et al., 2003), jedoch konnten einige Studien die Anwesenheit von zwei- und dreikernigen Muskelvorläufern in *loner*^{T1032} Mutanten demonstrieren (Beckett & Baylies, 2007; Bulchand et al., 2010). Um herauszufinden, ob *schizo*^{C1-28} mutante Embryonen ebenfalls einen solchen Muskelvorläufer ausbilden,

wurde die Anzahl der β -Galaktosidase exprimierenden Kerne in den FCs betrachtet. Dabei konnte in den meisten FCs/Muskeln nur ein Zellkern beobachtet werden (Abb. 8C). Jedoch konnte in einigen Fällen nicht genau unterschieden werden, ob zwei in der Nähe befindlichen Kerne zu einem Minimuskel gehören oder es sich um zwei distinkte, aneinandergelagerte Muskeln handelt (Abb. 8C, Stern). Aus diesem Grund sollten diese Experimente mit einem zusätzlichem Marker wiederholt werden, welcher die Plasmamembran der Myoblasten markiert und somit eine genau Abgrenzung der Myoblasten ermöglicht.

Diese Daten zeigen, dass in *schizo*^{C1-28} Mutanten wahrscheinlich keine Fusionen stattfinden und Schizo somit bereits für die initiale Fusion von FCs mit FCMs zur Ausbildung des Muskelvorläuferzellen notwendig ist. Die Annahme, dass in *schizo*^{C1-28} Mutanten nur einkernige FCs vorhanden sind, lässt weiterhin vermuten, dass *loner*^{T1032} ein schwächeres Allel als *schizo*^{C1-28} ist.

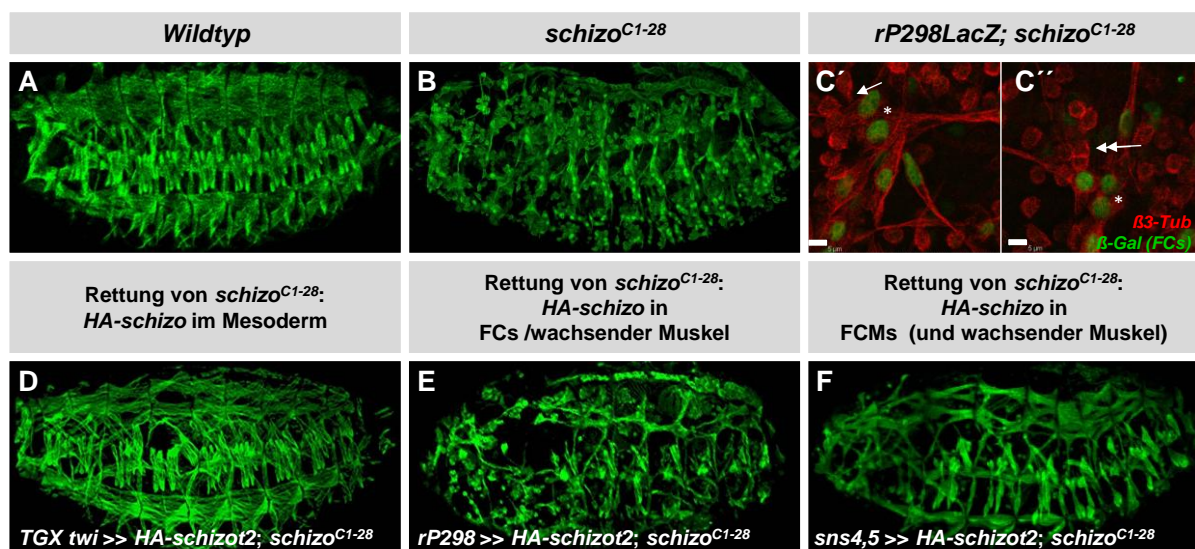


Abb. 8 In *schizo*^{C1-28} Mutanten sind größtenteils einkernige Myoblasten zu erkennen und der Fusionsphänotyp lässt sich durch die Expression von Schizo im Mesoderm retten

Anti- β 3-Tubulin-Antikörperfärbungen (A, B, D-F in grün; C in rot) an Stadium 16 Embryonen markiert unfusionierte Myoblasten und mehrkernige Muskeln. Anterior ist links, dorsal ist oben. In einem St. 16 Embryo sind im Wildtyp keine unfusionierte Myoblasten zu erkennen und die gebildeten Muskeln weisen eine charakteristische Anordnung auf (A). Homozygote *schizo*^{C1-28} mutante Embryonen zeigen einen drastischen Fusionsdefekt mit zahlreichen unfusionierten Myoblasten (B). (C) Eine zusätzliche anti- β -Galaktosidase Antikörperfärbung (grün) ermöglicht die Markierung der Kerne der FCs aufgrund der Enhancer-Trap Insertion *rP298-LacZ*. In *schizo*^{C1-28} Mutanten strecken FCMs Filopodien (C', Pfeil) in Richtung der FCs und adhären an die FCs (C'', Doppelpfeil). Die Anwesenheit von FCs mit nur einem Zellkern zeigt, dass in *schizo*^{C1-28} keine Fusionen stattfinden. Die mit einem Stern gekennzeichneten Muskeln entsprechen zu einer hohen Wahrscheinlichkeit zwei in der Nähe befindlichen FCs. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m.

Die Überexpression von wildtypischen SchizoP2 (UAS-*schizot2*) im Mesoderm unter Kontrolle des *twi*-Promotors in *schizo*^{C1-28} mutanten Hintergrund führt zur Wiederherstellung der Muskeln (D). Expression von SchizoP2 in FCs und wachsenden Muskeln mit Hilfe von *rP298-Gal4* (E) oder in FCMs, und nach erfolgter Fusion in wachsenden Muskeln mit *sns4,5-Gal4* (F) bewirkt eine partielle Wiederherstellung der Muskulatur.

3.2. Die Funktion von Schizo wird in FCs und FCMs benötigt

3.2.1. Der *schizo*^{CI-28} Fusionsdefekt lässt sich durch die Expression von Schizo im gesamten Mesoderm retten

schizo^{CI-28} mutante Embryonen zeigen einen drastischen Defekt in der Myoblastenfusion. Um zu verifizieren, dass dieser Phänotyp tatsächlich auf dem Funktionsverlust von Schizo beruht, wurden Rettungsexperimente unternommen. Dazu wurde zunächst der vollständige Leserahmen von *schizot2* (3939bp) zusammen mit einem N-terminalen HA-Tag bzw. N-terminalen V5-Tag in den Transformationsvektor pUAST kloniert und transgene Fliegen mit Hilfe der $\Delta 2$ -3 Transposase generiert (UAS-HA-*schizot2* und UAS-V5-*schizot2*, siehe 5.2.3; Tabelle 19). Für dieses Experiment wurde die SchizoP2-Isoform verwendet (Abb. 6; Abb. 18), für die bereits gezeigt werden konnte, dass sie den ZNS-Phänotyp von *schizo*^{CI-28} Mutanten retten kann (Önel et al., 2004). Die mesodermale Überexpression von SchizoP2 im wildtypischen Hintergrund erzeugt keinen Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Die gezielte Überexpression von HA-SchizoP2 im gesamten Mesoderm mit Hilfe von *twi*-Gal4 im *schizo*^{CI-28} mutanten Hintergrund konnte eine fast wildtypische Wiederherstellung der Muskulatur erreichen (Abb. 8D). Dieses Experiment zeigt, dass der in *schizo*^{CI-28} beobachtete Fusionsdefekt tatsächlich auf dem Verlust von Schizo resultiert.

In *Drosophila* findet die Myoblastenfusion heterolog zwischen zwei Zelltypen statt, den Founderzellen (FCs) und den Fusionskompetenten Myoblasten (FCMs). Im Laufe dieser Arbeit existierten kontroverse Aussagen, in welchem der beiden Zelltypen Schizo exprimiert wird. Chen et al. (2003) haben behauptet, dass Schizo ein FC-spezifisches Signalprotein ist, während Richardson et al. (2007) gezeigt haben, dass Schizo ebenfalls in FCMs exprimiert ist. Um aufzuklären, in welcher Myoblastenpopulation Schizo tatsächlich benötigt wird, wurden Rettungsexperimente mit verschiedenen Treiberlinien durchgeführt. Bei der *rP298*-Gal4 Treiberlinie handelt es sich um eine Insertion eines für Gal4 kodierenden P-elementes in die regulatorische Region des FC-spezifisch exprimierten Gens *duf*, so dass die Expression von UAS-Konstrukten ausschließlich in FCs und den wachsenden Muskeln erfolgt (Menon & Chia, 2001). Im Gegensatz induziert die *sns4,5*-Gal4 Treiberlinie die spezifische Expression von UAS-Konstrukten in den FCMs (Stute et al., 2006). Nach erfolgter Fusion zwischen FC und FCM kann das synthetisierte Gal4-Protein jedoch von den FCMs in den wachsenden Muskeln diffundieren. Allerdings konnte die spezifische Überexpression von HA-SchizoP2 ausschließlich in FCs/wachsenden Muskeln mit der *rP298*-Gal4 Treiberlinie (Abb. 8D), bzw. in FCMs und nach erfolgter Fusion in den wachsenden Muskeln (*sns4,5*-Gal4, Abb. 8E) nur eine partielle Rettung des Myoblastenfusionsdefektes erzielen. Interessanterweise scheint die Expression von HA-SchizoP2 in FCMs und nach der Fusion in den mehrkernigen Muskeln die Bildung der Muskulatur stärker zu fördern, da größere Muskelpartien und weniger unfusionierte Myoblasten zu erkennen sind. Das gleiche Ergebnis konnte auch bei Verwendung von UAS-V5-*schizot2* erzielt werden. IM Gegensatz zu den Behauptungen von Chen et al. (2003) weisen diese Experimente

eindeutig darauf hin, dass Schizo sowohl in FCs als auch in FCMs für die Fusion der Myoblasten benötigt wird.

Als nächstes stellt sich die Frage, welche Funktion Schizo in den Myoblasten ausüben könnte. Daher ist es notwendig, Schizo zunächst in die bisher bekannten Signalkaskaden einzuordnen. Die Erkennung, Adhäsion und Initiation des Fusionsprozesses wird durch die Transmembran-Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie vermittelt, welche über ihre intrazellulären Domäne in der Rekrutierung von fusionsrelevanten Proteinen agieren und als Signalplattform dienen (Kesper et al., 2007). Aufgrunddessen, dass Schizo für ein intrazelluläres Signalprotein kodiert und Schizo Homologe direkt mit Oberflächenrezeptoren interagieren (Dunphy et al., 2006; Hiroi et al., 2006; Morishige et al., 2009; Scholz et al., 2010) sollte zunächst die Interaktion von Schizo mit den Transmembranmolekülen untersucht werden.

3.2.2. Schizo interagiert direkt mit den Ig-Transmembran-Rezeptoren Rst und Sns

Für Schizo konnte gezeigt werden, dass es in transfizierten *Drosophila* S2 Zellen in Abhängigkeit von dem Ig-Domänen-Transmembranmolekül Duf an Punkte des Zell-Zellkontaktes rekrutiert wird (Chen et al., 2003). Die Tatsache, dass Schizo sowohl in FCs als auch in FCMs benötigt wird, könnte zudem daraufhinweisen, dass Schizo auch mit den FCM-ständigen Transmembran-Rezeptoren Rst, Sns und Hbs interagiert. Aus diesem Grund wurde die direkte Interaktion von Schizo mit den intrazellulären Domänen von Duf, aber auch von Rst, Sns und Hbs im Hefe-Zwei-Hybrid-System (Kap. 5.5) untersucht.

Der vollständige Leserahmen von *schizo* (3939 bp) wurde in den Vektor pGilda kloniert, so dass nach Expression in den Hefezellen ein Fusionsprotein bestehend aus der DNA-Bindungsdomäne und Schizo-fl resultiert (BD_Schizo-fl). Die intrazellulären Domänen der Transmembran-Rezeptoren Duf, Rst, Sns und Hbs bilden nach der Expression Fusionsproteine mit einer N-terminalen Aktivierungsdomäne (AD) (AD_Duf-intra/pB42AD: Diplomarbeit Nina Reichert, 2004; AD_Rst-intra, AD_Sns-intra und AD_Hbs-intra/pB42AD: Doktorarbeit K. B. Sankara Reddy). Interessanterweise konnte in zwei von drei unabhängigen Experimenten eine Interaktion von Schizo mit der intrazellulären Domäne von Rst (Abb. 9Abb. 9A-3), sowie von Schizo und der intrazellulären Domäne von Sns (Abb. 9A-4) festgestellt werden. Dabei führte die Bindung von Schizo an Rst eher zu einer Blaufärbung der Kolonien als in Kombination mit Sns, was auf eine stärkere Interaktion zwischen Schizo und Rst hinweisen könnte. Es konnte jedoch keine Interaktion zwischen Schizo und der intra-zellulären Domäne von Duf oder Hbs nachgewiesen werden (Abb. 9A-2,5). In Kontrollexperimenten mit alleinigen BD oder AD konnte keine Blaufärbung beobachtet werden (Abb. 9A-1, B).

Die Beobachtung, dass Schizo mit der intrazellulären Domäne von Rst und Sns interagiert, unterstützt den aus den Rettungsexperimenten gewonnenen Befund, dass Schizo auch eine Funktion in den FCMs besitzt. Neueste Untersuchungen von Bulchand et al. (2010) konnten weiterhin zeigen, dass Schizo in

Co-Immunopräzipitationsexperimenten mit Duf interagiert. Dies könnte daraufhin deuten, dass die Interaktion von Schizo und Duf entweder über posttranskriptionelle Modifizierung von Duf reguliert wird oder über ein Adaptorprotein erfolgt.

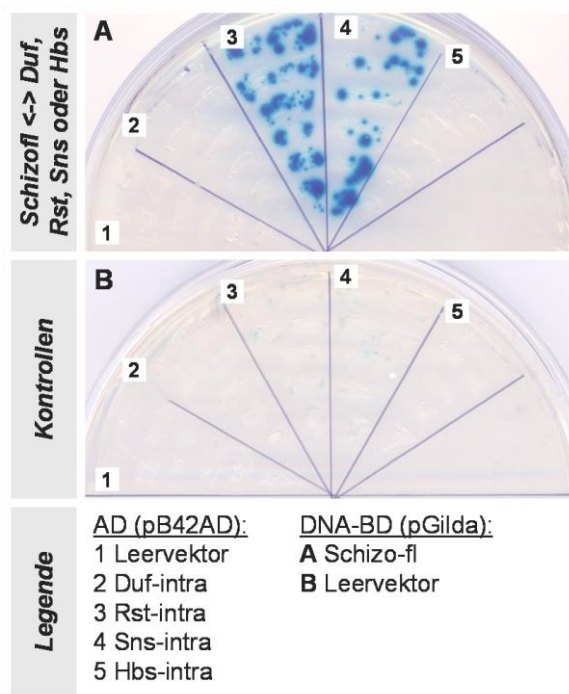


Abb. 9 Schizo interagiert mit der intrazellulären Domäne von Rst und Sns, jedoch nicht mit der intrazellulären Domäne von Duf und Hbs

Das vollständige Schizo Protein (Schizo-fl) wurde an die DNA-Bindungsdomäne (BD) fusioniert, während die intrazellulären Domänen von Duf (2), Rst (3), Sns (4) und Hbs (5) ein Fusionsprotein mit der B42-Aktivierungsdomäne (AD) bilden (siehe Legende). Interaktion der getesteten Proteine wird durch Wachstum und Blaufärbung der Kotretransformanten auf IPTG/X-Gal haltigen Induktionsplatten angezeigt. Exemplarische Aufnahmen des Interaktionstest: BD-Schizo-fl interagiert mit der intrazellulären Domäne von Rst (A-3) und Sns (A-4), jedoch nicht mit der intrazellulären Domäne von Duf (A-2) oder Hbs (A-5) (A). Kontrolleexperimente mit der ausschließlichen der AD (A-1) oder ausschließlich der DB (B-1 – B-5) konnte kein Wachstum oder Blaufärbung (B) beobachtet werden.

3.3. Untersuchungen zur Funktion von Schizo als Arf-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor und zur Relevanz der Arf-GTPasen während der Myoblastenfusion

Schizo gehört zu den Sec7-Domänen beinhaltenden Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (GEF), die den GDP/GTP Austausch an Arf Proteinen katalysieren. Neben der gemeinsamen katalytischen Sec7-Domäne zeichnen sich die meisten GEFs durch weitere funktionelle Domänen aus und werden anhand ihrer Domänen Struktur in weitere Unterfamilien unterteilt (Casanova, 2007; Gillingham & Munro, 2007). Schizo gehört dabei zu der Unterfamilie der IQ-Sec7/BRAG-GEFs, die neben der charakteristischen Sec7-Domäne eine PH-Domäne und eine IQ-Domäne aufweisen (Chen et al., 2003, Önel et al., 2004). BRAGs sind vorwiegend in der Aktivierung von Arf6 involviert (Someya et al. 2001, Dunphy et al. 2006, Hiroi et al., 2006). *In vitro* GDP-Freisetzungsstudien haben zudem gezeigt, dass Schizo den Austausch an *Drosophila* Arf6 vermitteln kann (Chen et al., 2003). Allerdings zeigen Mutanten, in denen sowohl zygotisches als auch maternales *d-arf6* fehlt, keine Fusionsstörungen in der embryonalen Muskulatur (Dyer et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass D-Arf6 *in vivo* entweder nicht durch Schizo aktiviert wird oder in funktioneller Redundanz mit einem anderen Arf-Protein agiert. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle der *Drosophila* Arf Proteine *d-arf1*, *d-arf2* und *d-arf6* während der Myoblastenfusion näher untersucht.

3.3.1. mRNA-Verteilung von *Drosophila d-arf1*, *d-arf2* und *d-arf6*

Für eine zell-autonome Funktion in der Muskelentwicklung wird eine Expression in dem somatischen Mesoderm vorausgesetzt. Um das Transkriptionsmuster der *Drosophila arf* Gene zu analysieren, wurden *in situ*-Hybridisierungen mit RNA-Proben gegen *d-arf1*, *d-arf2* bzw. *d-arf6* durchgeführt (Abb. 10). Schon im synzytialen Blastoderm Stadium konnte die mRNA der *arf* Gene detektiert werden, was zeigt, dass alle *arf* mRNAs maternal bereit gestellt werden (Abb. 10A-C). Weiterhin zeichnen sich sowohl *d-arf1*, *d-arf2* als auch *d-arf6* durch eine nahezu ubiquitäre Transkription während der gesamten Embryogenese aus (Abb. 10D-F). Aufgrund des Expressionsmuster kann somit weder eine Arf-GTPase für eine Rolle in der Myoblastenfusion hervorgehoben noch ausgeschlossen werden.

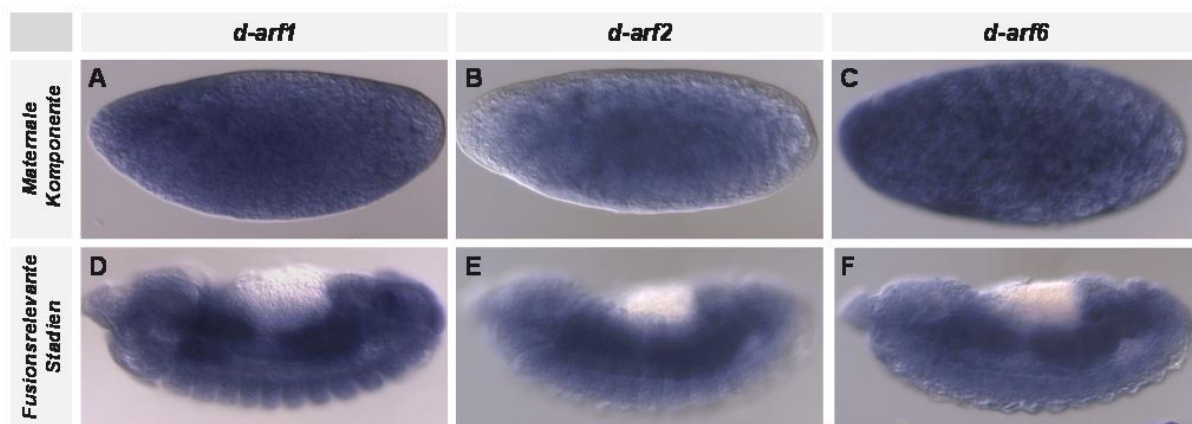


Abb. 10 mRNA Verteilung von *Drosophila arf1*, *arf2* und *arf6*

In situ-Hybridisierungen an *whole mount*-Embryonen mit RNA-Sonden gegen *d-arf1* (A, D), *d-arf2* (B, E) bzw. *d-arf6* (C, F). Maternale Komponente (A-C). Ubiquitäre mRNA Verteilung während Stadium 14 (D-F).

3.3.2. Überexpressionsanalysen und Rettungsexperimente mit GDP-gebundenen und GTP-gebundenen Varianten der *Drosophila* Arf Proteine

Arf-GTPasen gehören zu der Superfamilie der Ras-ähnlichen GTP-bindenden Proteine und sind durch die Anwesenheit der hochkonservierten Guanin-Nukleotid-Bindemotive charakterisiert (Gillingham & Munro, 2007, Abb. 3). Eine mögliche Funktion von D-Arf1, D-Arf2 und D-Arf6 sollte zunächst durch Überexpressionsanalysen mit Arf-Varianten untersucht werden, die in dem GDP/GTP-Zyklus gestört sind. Der T->N-Austausch in der Nähe der Switch I-Region (Abb. 3) verändert die Guanin-Nukleotid-Bindungsaffinität und resultiert in einer GDP-gebundenen, inaktiven Form der Arf-GTPase. Im Gegensatz dazu beeinträchtigt die Q->L-Substitution in der Switch II Region (Abb. 3) die Hydrolyse des gebundenen GTPs und führt somit zu einer konstitutiv-aktiven, GTP-gebundenen Arf-GTPase. Zunächst wurde durch sequenzgerichtete Mutagenese jeweils die T-N bzw. die Q-L Substitution (siehe Abb. 3, rote Pfeile) in die cDNAs für *d-arf6*, *d-arf1* bzw. *d-arf2* eingeführt (LD24904: *d-arf1-T31N*, *d-arf1-Q71L*, LD22876: *d-arf6-T27N* in Zusammenarbeit mit Sabina Huhn und RE53354: *d-arf2-T31N* und *d-arf2-Q71L*, Bachelorarbeit Torben Meyer, 2009). Nach Klonierung in den

Transformationsvektor pUAS_t konnten mittels P-Transposase-vermittelter Integration (Kap. 5.2.3) die folgenden Fliegenstämme etabliert werden: UAS-*d-arf1-T31N*, UAS-*d-arf1-Q71L*, UAS-*d-arf2-Q71L* und UAS-*d-arf6-T27N* (Kap. 5.2.3; Tabelle 19 Generierte transgene Fliegenstämme), jedoch schlug auch nach viermaliger Injektion des UAS-*d-arf2-T31N* Konstruktes die Generierung transgener Fliegen fehl. Aus diesem Grund wurden die kodierenden Regionen von *d-arf2-Q71L* und *d-arf2-T31N* über das Gateway-System (Kap. 5.2.3) in Transformationsvektor pUAS_t-attB-rfa-EGFP kloniert und über ϕ 31-vermittelte Integration transgene Fliegen etabliert (Kap. 5.2.3; Tabelle 19). Die Injektion erfolgte in den Fliegenstamm ϕ X-86Fb (BL24749), so dass die Integration der UAS-Konstrukte auf dem dritten Chromosom an der zytologischen Position 86F erfolgen sollte. Dies minimiert den zeitlichen Aufwand, um stabile Linien zu etablieren. Beide D-Arf2-Varianten verfügen zusätzlich über einen C-terminalen EGFP-Anhang und werden daher im Folgenden UAS-*d-arf2-Q71L-EGFP* und UAS-*d-arf2-T31N-EGFP* genannt. Fliegen, die ein UAS-*d-arf6-Q67L* Konstrukt integriert haben, wurden von E.Chen zur Verfügung gestellt.

3.3.2.1. Die mesodermale Überexpression von GDP-gebundenen, inaktiven D-Arf6 oder GTP-gebundenem, aktiven hat keinen Einfluss auf die Myoblastenfusion

Zunächst wurde die Funktion der D-Arf6 GTPase analysiert. Sollte D-Arf6 eine Rolle in der Myoblastenfusion spielen, dann sollte die mesodermale Überexpression einer GDP-gebundenen Form von D-Arf6 als dominant negativ wirken und in der Lage sein einen Phänokopie des *schizo* mutanten Phänotyps zu erzeugen. Die Überexpression von GDP-gebundenen, inaktiven D-Arf6 (UAS-*d-arf6-T27N*) im gesamten Mesoderm hatte jedoch keinen Einfluss auf die Myoblastenfusion (Abb. 11A, Tabelle 3). Insbesondere führte auch die FC-spezifische Überexpression des GDP-gebundenen, inaktiven D-Arf6 mit Hilfe der *rP298*-Gal4 Treiberlinie zu keinen Fusionsstörungen (Tabelle 3), was in einem weiteren Gegensatz zu den von Chen et al. (2003) postulierten Daten steht. Embryonen, in denen GTP-gebundenes, aktives D-Arf6 (UAS-*d-arf6-Q67L*) mit Hilfe verschiedener Treiberlinien in mesodermalen Zellen überexprimiert wurde, zeigten ebenso eine nahezu wildtypisches Muskelmuster (Abb. 11B, Tabelle 3).

Es führte also weder die mesodermale Überexpression von GTP-gebundenen, aktiven D-Arf6, noch die Überexpression von GDP-gebundenen, inaktiven D-Arf6 zu Defekten in der Myoblastenfusion. Die Tatsache, dass *Drosophila arf6* ubiquitär exprimiert wird und eine starke maternale Komponente aufweist (Abb. 10), könnte allerdings bewirken, dass überexprimiertes D-Arf6 nicht in der Lage ist das endogen vorhanden D-Arf6 zu verdrängen und daher kein Phänotyp zu beobachten ist. Gegen diese Vermutung sprechen allerdings die Analysen von Dyer et al. (2007) welche gezeigt haben, dass Embryonen, denen maternales und zygotisches *d-arf6* fehlt, auch keinen Fusionsdefekt aufweisen.

3.3.2.2. Der *schizo*^{CI-28} Fusionsdefekt lässt sich nicht durch die Überexpression von GTP-gebundenen D-Arf6 retten

Um weiter zu untersuchen, ob Schizo in der Aktivierung von D-Arf6 involviert ist, wurden Rettungsexperimente mit der GTP-gebundenen, aktiven Form von D-Arf6 durchgeführt. Die mesodermale Überexpression des GTP-gebundenen D-Arf6 (UAS-*d-arf6-Q67L*) mit Hilfe von *twi*-Gal4 im *schizo*^{CI-28} mutanten Hintergrund war jedoch nicht in der Lage, den Fusionsdefekt von *schizo* Mutanten aufzuheben (Abb. 11C). Ebenso führte auch die zelltypspezifische Expression in FCs/wachsenden Muskeln oder in FCMs und nach der Fusion in wachsenden Muskeln mit Hilfe von *rP298*-Gal4 bzw. *sns4,5*-Gal4 zu keiner Rettung des *schizo*^{CI-28} mutanten Phänotyps (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Experimenten kann einerseits geschlussfolgert werden, dass Schizo vermutlich nicht über die GTP-gebundene Form von D-Arf6 wirkt. Andererseits besteht aber auch die Möglichkeit, dass Schizo nicht in der Aktivierung, sondern auch an der Lokalisation des aktivierten D-Arf6 beteiligt ist und daher das D-Arf6 nicht in der Lage ist, den *schizo* mutanten Phänotyp zu retten.

Als nächstes sollte daher überprüft werden, ob Schizo über eine andere GTPase wirkt. Im Folgendem wurde die Rolle der D-Arf1 GTPase untersucht.

3.3.2.3. Die Überexpression von GTP-gebundenen D-Arf1 bewirkt eine partielle Rettung des *schizo*^{CI-28} mutanten Fusionsdefektes

Um herauszufinden, ob GTP-gebundenes, aktives D-Arf1 den Verlust von *schizo* während der Myoblastenfusion ersetzen kann, wurde D-Arf1-Q71L (UAS-*d-arf1-Q71L*) mit Hilfe von *twi*-Gal4 in *schizo*^{CI-28} mutanten Embryonen im Mesoderm überexprimiert. Die phänotypische Untersuchung dieser Embryonen mittels einer β 3-Tubulin-Färbung hat interessanterweise gezeigt, dass die Einführung von GTP-gebundenen, aktiven D-Arf1 eine partielle Wiederherstellung der Muskulatur ermöglicht. Im Gegensatz zu *schizo*^{CI-28} mutanten Embryonen (siehe Abb. 8B) traten mehrkernige Muskeln auf (Pfeilkopf, Abb. 11H), und nur wenige unfusionierte Myoblasten waren zu erkennen. Dies könnte darauf hinweisen, dass Schizo *in vivo* in der Aktivierung von D-Arf1 involviert ist.

Dabei ist allerdings zu bemerken, dass diese Embryonen eine veränderte Morphologie aufweisen. Es wurden nur zufällig einzelne Muskelpartien gebildet und das Muster der Muskeln erscheint unregelmäßig. Aus diesem Grund wurde im Folgendem untersucht, ob die Überexpression von GTP-gebundenem, aktiven D-Arf1 einen Einfluss auf die Myogenese hat.

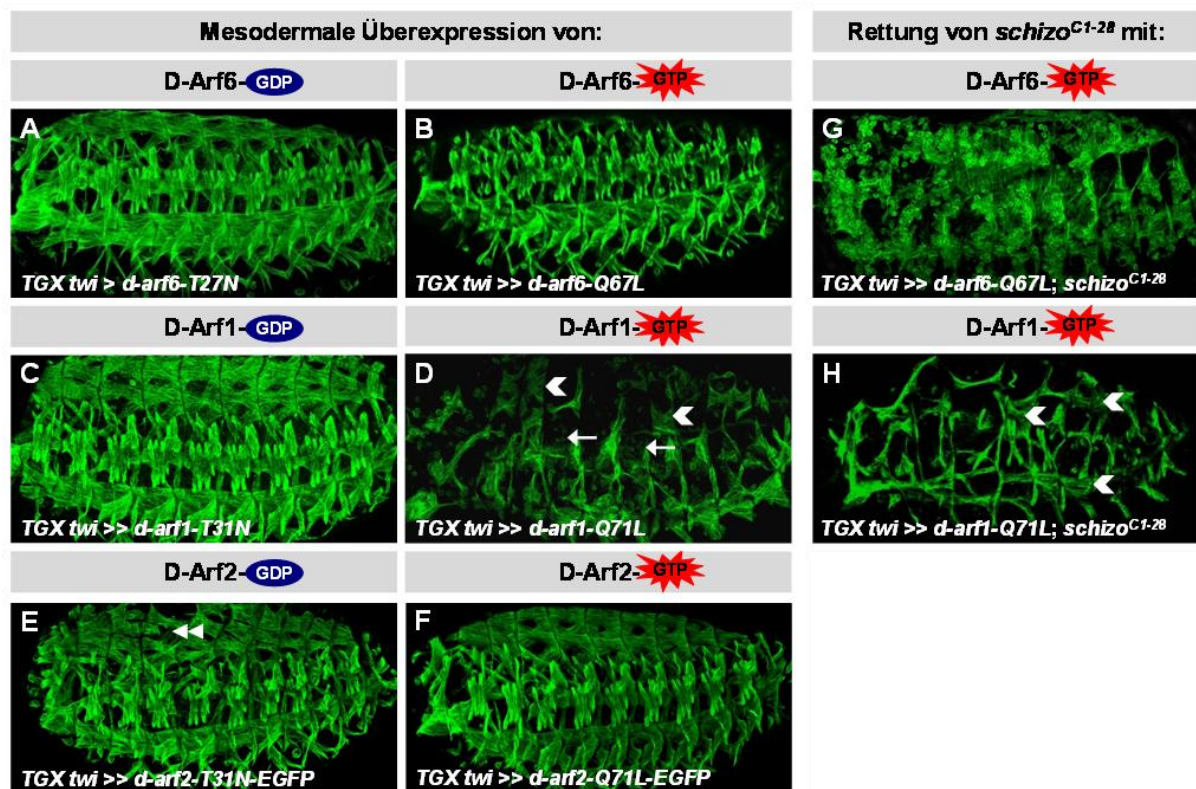


Abb. 11 Überexpressionsanalysen und Rettungsexperimente mit GTP- und GDP-gebundenen Formen von D-Arf1, 2 und 6

β3-Tubulin-Antikörperfärbungen an Stadium 16 Embryonen. Anterior ist links, dorsal ist oben.

Die mesodermale Überexpression (*twi*-Gal4) von inaktivem, GDP-gebundenem D-Arf6 (UAS-*d-arf6-T27N*, **A**), aktivem, GTP-gebundenem D-Arf6 (UAS-*d-arf6-Q67L*, **B**), inaktivem, GDP-gebundenem D-Arf1 (UAS-*d-arf1-T31N*, **C**), bzw. aktivem, GTP-gebundenem D-Arf2 (UAS-*d-arf2-Q71L-EGFP*, **F**) hat keine negativen Auswirkungen auf die Bildung der Muskulatur, während die Überexpression von aktivem, GTP-gebundenem D-Arf1 (UAS-*d-arf1-Q71L*, **D**) in Störungen der Muskelentwicklung mit unfusionierten Myoblasten (Pfeil), aber auch kleineren Muskeln (Pfeilkopf) resultiert. Expression von GDP-gebundenem D-Arf2 (UAS-*d-arf2-T31N-EGFP*) führt in einigen Embryonen zur vereinzelt Ablösung von Muskeln (Doppelpfeilkopf, **E**).

Aktives, GTP-gebundenes D-Arf6 ist nicht in der Lage, den Fusionsdefekt von *schizo*^{C1-28} mutanten Embryonen aufzuheben (**E**), jedoch bewirkt die Expression von aktivem, GTP-gebundenem D-Arf1 im *schizo*^{C1-28} mutanten Hintergrund eine partielle Wiederherstellung der Muskulatur mit mehrkernigen Muskeln (Pfeilkopf, **F**).

3.3.2.4. Die Überexpression von GTP-gebundenem D-Arf1 im Mesoderm resultiert in Defekten in der Muskelentwicklung

Die mesodermale Überexpression des GTP-gebundenen, aktiven D-Arf1 (UAS-*d-arf1-Q71L*) im *twi*-Muster (Stadium 7-12) führte zu deutlichen Störungen in der Muskelentwicklung (Abb. 11D und Abb. 12A, B, Tabelle 3). In Stadium 15 Embryonen waren unfusionierte Myoblasten (Pfeil), Lücken in der Muskulatur (Stern), aber auch kleinere Muskeln (Pfeilkopf) zu erkennen, was auf einen partiellen Fusionsdefekt hinweist. Die Adhäsion der FCMs an FCs oder Minimuskeln schien durch überexprimiertes D-Arf1-Q71L nicht beeinflusst. Gegen Ende der Embryogenese (St. 16) waren die unfusionierten Myoblasten bereits eliminiert und größtenteils gestreckte (Pfeilkopf), aber auch gestauchte Minimuskeln (Doppelpfeilkopf) zu erkennen (Abb. 12B). Des Weiteren ist zu bemerken, dass die Embryonen nicht wie typische Fusionsmutanten aussehen, sondern besonders im dorsalen

Bereich größere Lücken und Unregelmäßigkeiten in der Muskulatur und zudem morphologische Störungen aufweisen (Abb. 12A, B). *mef2*-getriebene Expression des GTP-gebundenem D-Arf1 im Mesoderm während der Stadien 11-15 führte zwar zu unfusionierten Myoblasten (Pfeil) und Minimuskeln (Pfeilkopf) (Abb. 12C), jedoch nicht in der starken Ausprägung wie nach Verwendung der *twi*-Gal4 Treiberlinie. Außerdem konnte in Stadium 16/17 Embryonen die Ablösung der Muskeln und die damit verbundene runde, gestauchte Gestalt dieser Muskeln beobachtet werden (Doppelpfeilkopf, Abb. 12D). Die mit *twi*-Gal4 beobachteten Dorsalschlussprobleme traten bei Verwendung der *mef2*-Gal4 Treiberlinie nicht auf.

Ein Überschuss an GTP-gebundenem, aktiven D-Arf1 im Mesoderm führt zu Störungen in der Myogenese. Daraus können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden. Die beobachteten Fusionsdefekte könnten daraufhindeuten, dass die Regulation der D-Arf1 GTPase für die Myoblastenfusion von essentieller Bedeutung ist. Die Tatsache, dass die Expression von D-Arf1-GTP im späten Mesoderm zu der Ablösung der Muskeln führt, könnte weiterhin darauf hinweisen, dass D-Arf1 zusätzlich eine Rolle in der Muskelanheftung spielt. Auf der anderen Seite besteht aber auch die Möglichkeit, dass die mit *twi*-Gal4 beobachteten Fusionsstörungen nicht auf einem fehlerhaften Fusionsmechanismus zurückzuführen sind, sondern es sich dabei um sekundäre Defekte handelt, die auf Defekten in der Mesodermspezifikation zurückzuführen sind. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Embryonen eine veränderte Morphologie aufweisen und Unregelmäßigkeiten der Muskeln zeigen. Aus diesem Grund sollte die Spezifikation der FCs und FCMs überprüft werden.

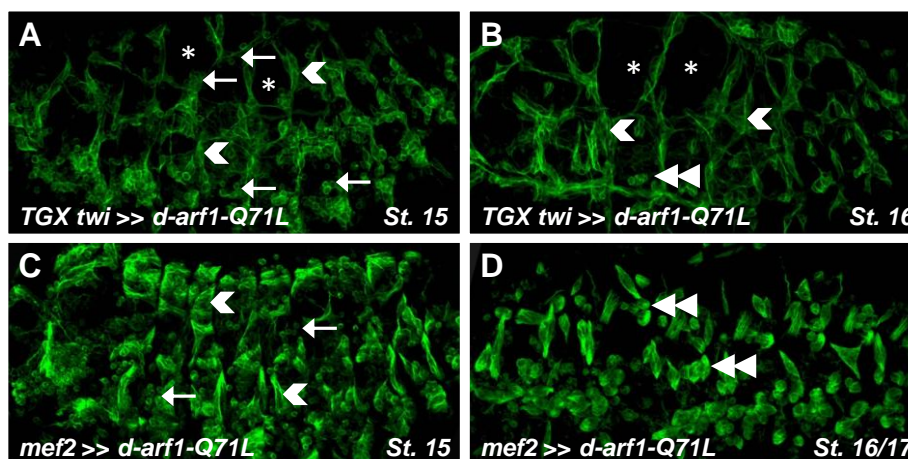


Abb. 12 Mesodermale Expression von D-Arf1-Q71L im *twi*- und im *mef2*- Muster

β3-Tubulin Antikörperfärbung an St 15 (A, C) und St. 16/17 (C, D) Embryonen. Anterior ist links, dorsal ist oben. Lateralansicht. *twi*-getriebene Expression (Mesoderm St. 7-12) von GTP-gebundenem D-Arf1 (UAS-*d-arf1-Q71L*, (A, B) resultiert in unfusionierten Myoblasten (Pfeil), Lücken in der Muskulatur (Stern), aber auch Minimuskeln (Pfeilkopf), von denen sich wenige gegen Ende der Embryogenese ablösen (Doppelpfeil). Mesodermale Expression des GTP-gebundenem D-Arf1 im *mef2*-Muster (Mesoderm St. 10-15) führt zu unfusionierten Myoblasten (Pfeil) und Minimuskeln (Pfeilkopf) im späten Stadium 15 (C), sowie zu einem durch die Anwesenheit von gestauchten, abgerundeten Muskeln (Doppelpfeilkopf) charakterisierten Anheftungsdefekt in Stadium 16/17 (D).

3.3.2.5. Die Überexpression von GTP-gebundenem D-Arf1 führt nicht zu Determinationsstörungen von FCs und FCMs

Für die Überexpressionsanalysen mit der GTP-gebunden Form von D-Arf1 wurden unterschiedliche mesodermale Treiberlinien verwendet (Tabelle 3). *twi*-Gal4 aktiviert die Expression der UAS-Konstrukte im gesamten Mesoderm während der Stadien 7-12 und somit bereits während der Einwanderung des Mesoderms und der Spezifikation der Myoblasten. Im Gegensatz dazu beginnt die *mef2*-getriebene Expression der UAS-Konstrukte erst während dem Stadium 11, einem Zeitpunkt, wo die Spezifikation der Myoblasten bereits größtenteils abgeschlossen ist. Die Tatsache, dass nur die frühe Überexpression des GTP-gebundenem D-Arf1 in dem gesamten Mesoderm mit *twi*-Gal4 zu starken Defekten in der Muskelentwicklung führt, kann darauf hindeuten, dass ein Überschuss an aktivierten D-Arf1 zu Störungen in der Determination von FCs und FCMs führt. Um dies auszuschließen, wurde das Vorhandensein von FCs und FCMs mit Hilfe spezifischer Marker untersucht. Die Spezifikation der FCs wurde mit Hilfe der Enhancer-Trap-Insertion *rP298-LacZ* untersucht, welche β -Galaktosidase unter der Kontrolle der *duf* regulatorischen Region in den Kernen der FCs und wachsenden Muskeln exprimiert (Nose et al., 1998). Die *rP298-LacZ*-Insertion wurde dabei in den UAS-*d-arf1-Q71L* Transgen tragenden Fliegenstamm eingekreuzt. Im Vergleich zum Wildtyp schien die stereotypische Anordnung und Anzahl der FCs durch die Überexpression von GTP-gebundenen D-Arf1 im *twi*-Muster nicht negativ beeinflusst zu werden (Abb. 13), was zeigt, dass die initiale Determination der FCs auch bei überexprimierten D-Arf1-GTP korrekt abläuft. Um die Determination der FCMs zu überprüfen, wurden *in situ*-Hybridisierungen gegen das FCM-spezifisch transkribierte *sns* durchgeführt. Die Menge der *sns* positiven Zellen scheint durch die Überexpression von GTP-gebundenem D-Arf1 im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinflusst, auch wenn die Lage oder Verteilung der FCMs etwas vom Wildtyp abweicht (Abb. 13). Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass die Spezifikation der FCs und FCMs durch die Überexpression des GTP-gebundenen D-Arf1 nicht gestört wird. Weitere Defekte in der Mesodermentwicklung können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

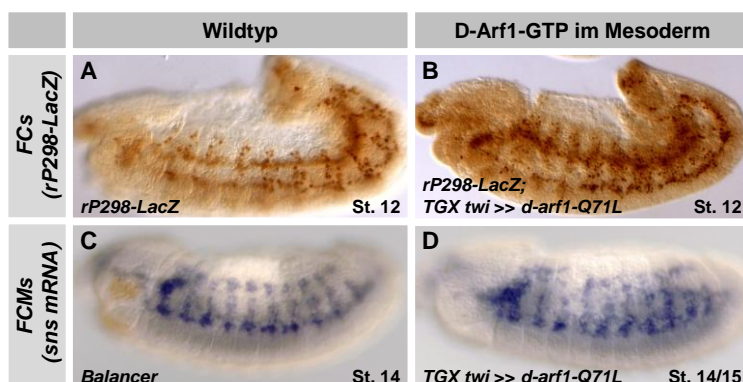


Abb. 13 Mesodermale Expression von GTP-gebundenem D-Arf1 hat keinen Einfluss auf die Determination von FCs und FCMs

Anti- β -Gal-Antikörperfärbungen an Embryonen (A,B), in denen β -Galaktosidase in den Kernen der FCs und wachsenden Muskeln aufgrund der Enhancer-Trap-Insertion *rP298-LacZ* exprimiert wird. *In situ*-Hybridisierungen mit einer *sns*-RNA-Sonde markieren FCMs (C, D).

Embryonen sind entweder wildtypisch (A, C) oder exprimieren aktives, GTP-gebundenes D-Arf1 (UAS-*d-arf1-Q71L*) im Mesoderm mit Hilfe der *twi*-Gal4-Treiberlinie (B, D). Die Determination von FCs und FCMs erfolgt korrekt in Embryonen, die mesodermal aktives D-Arf1 exprimieren.

3.3.2.6. Die mesodermale Überexpression von GDP-gebundenen, inaktiven D-Arf1 erzeugt keinen Fusionsdefekt

Die Tatsache, dass GTP-gebundenes D-Arf1 eine partielle Rettung des *schizo*^{C1-28} Fusionsdefekt erreichen kann, deutet darauf hin, dass Schizo *in vivo* in dem GDP/GTP-Austausch an D-Arf1 involviert ist. Die Überexpression eines GDP-gebundenen D-Arf1 im Mesoderm sollte daher eine Phänokopie des *schizo*^{C1-28} mutanten Phänotyps bewirken. Die mesodermale Expression von dauerhaft GDP-gebundenen D-Arf1 (UAS-*d-arf1-T31N*) mit Hilfe von verschiedenen Treiberlinien konnte jedoch keinen Fusionsdefekt hervorrufen (Abb. 11C, Tabelle 3 Übersicht über Überexpressionsanalysen mit GDP- und GTP-gebundenen Varianten der Arfs). Dies könnte einerseits bedeuten, dass der Verlust der D-Arf1-Aktivität keine Auswirkung auf die Myoblastenfusion hat. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass das überexprimierte D-Arf1-T31N nicht ausreichend ist, um das endogene D-Arf1 zu verdrängen.

3.3.2.7. Die Überexpression von GTP-gebundenem D-Arf2 hat keinen Einfluss auf die Myoblastenfusion, während die Expression von GDP-gebunden, inaktiven D-Arf2 in der Ablösung der Muskeln von den Anheftungsstellen resultiert

Abschließend wurde die Rolle von D-Arf2 untersucht. Die mesodermale Überexpression des GTP-gebundenen, aktiven D-Arf2 (UAS-*d-arf2-Q71L*, bzw. UAS-*d-arf2-Q71L-EGFP*) führte nicht zu Fusionsdefekten (Abb. 11F, Tabelle 3). Anti-GFP Antikörperfärbungen konnten überexprimiertes D-Arf2-Q71L-EGFP erfolgreich im Mesoderm nachweisen. Auf dem ersten Blick zeigt D-Arf2-Q71L-EGFP jedoch keine distinkte Lokalisation in den Myoblasten, sondern liegt eher zytoplasmatisch vor (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu führte die Expression von GDP-gebundenen, inaktiven D-Arf2 (UAS-*d-arf2-T31N-EGFP*) im *twi*-Muster (Mesoderm St. 7-12) zu einem variablen Muskelphänotyp, der von einer nahezu wildtypischen Muskulatur bis hin zur Ablösung von einzelnen Muskelgruppen reichte (Abb. 11 E; Abb. 14A-C). Dabei konnte keine Spezifität einzelner betroffener Muskeln oder Muskelgruppen beobachtet werden. Expression von inaktivem, GDP-gebundenem D-Arf2 (UAS-*d-arf2-T31N-EGFP*) im Mesoderm mit Hilfe der später und länger exprimierenden *mef2*-Gal4 Treiberlinie (Mesoderm St. 11-15) führte zu einem noch stärkerem Anheftungsdefekt der Muskeln mit 100 % Penetranz. Die Ablösung der somatischen Muskeln von ihrer epidermalen Anheftungsstelle beginnt im Stadium 15 und schreitet bis Stadium 17 fort (Abb. 14D, E, G), in dem schließlich nahezu alle Muskeln eine gestauchte, abgerundete Form annehmen (Abb. 14F). Die Tatsache, dass während Stadium 15/frühes Stadium 16 zunächst mehrkernige Muskeln und keine unfusionierte Myoblasten beobachtet werden konnten, zeigt, dass kein Fusionsdefekt vorliegt. Mesodermale Expression von GDP-gebundenen D-Arf2 interferiert zudem mit der Entwicklung des Dorsalgefäßes, welches dem Herz von *Drosophila* entspricht (Klammer, Abb. 14D). Erste Beobachtungen konnten keine distinkte Lokalisation von D-Arf2-T31N-EGFP in den Muskeln feststellen (Abb. 14G). Die hier beschriebenen Phänotypen

können nicht auf das C-terminal angehängte EGFP oder die phiC31-vermittelte Integration des D-Arf2-T31N-EGFP Konstruktes zurückgeführt werden, da erstens der Phänotyp in Abhängigkeit von der verwendeten Treiberlinie variiert und zweitens die Überexpression von D-Arf2-Q71L-EGFP keinen Phänotyp zeigt.

Zusammengefasst resultiert die Expression eines GDP-gebundenem, inaktiven D-Arf2 zwar nicht in Fusionsdefekten, jedoch zur Ablösung der Muskeln. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass D-Arf2 zumindest eine Rolle bei der Anheftung der Muskeln spielt. Die Durchführung von Rettungsexperimenten mit der aktivierten Form von D-Arf2, um aufzuklären, ob Schizo in der Aktivierung von D-Arf2 fungiert, konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

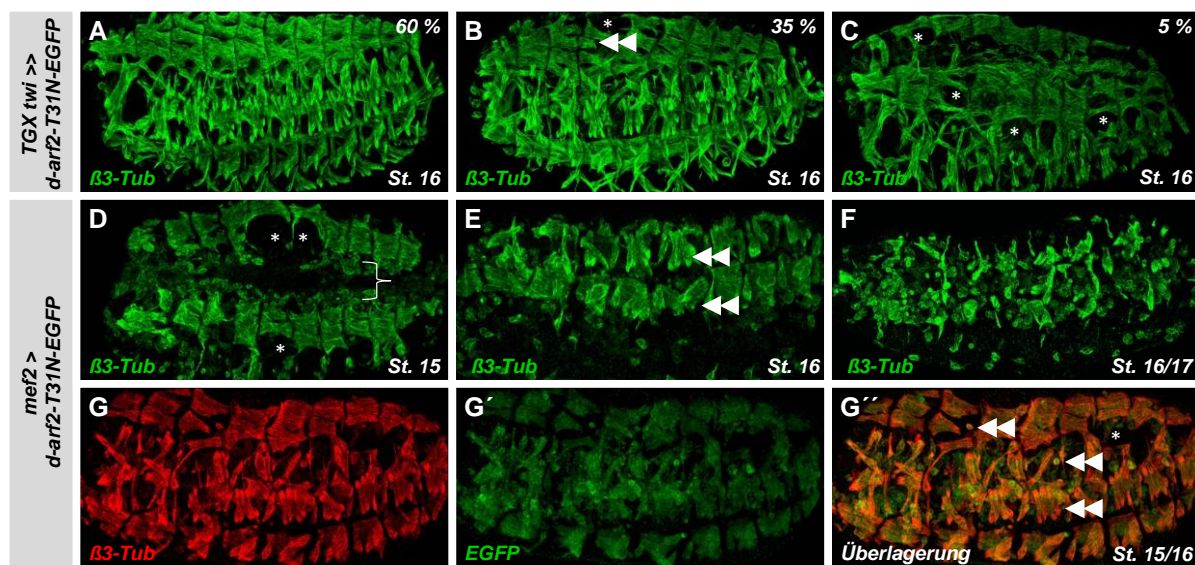


Abb. 14 Mesodermal exprimiertes D-Arf2-T31N führt zu der Ablösung der somatischen Muskeln

β3-Tubulin-Antikörperfärbung an Stadium 15-17 Embryonen. Anterior ist links, Dorsal ist oben. Lateralansicht (A-C, E-G) und Dorsalansicht (D). Die Expression von GDP-gebundenem D-Arf2-T31N-EGFP (UAS-*d-arf2-T31N-EGFP*) im *twi*-Muster (Mesoderm St. 7-12) hatte in 60 % der Embryonen keine Auswirkung auf die somatische Körperwandmuskulatur (A), führte jedoch in 35 % der Embryonen zur Ablösung der Muskeln in 1 bis 2 Segmenten (Doppelpfeilkopf) (B) bzw. in 5 % zu verkürzten Muskeln und zur Ablösung der Muskeln in mehreren Segmenten (Doppelpfeilkopf) (C). *mef2*-getriebene Expression (Mesoderm St. 11-15) von D-Arf2-T31N-EGFP resultierte in einer drastischen Ablösung der Muskeln und folglich zu Lücken in der Muskulatur (Stern), sowie zu verkürzten, gestauchten, und abgerundeten Muskeln (Doppelpfeilkopf) (D, E, G). Defekte in der Ausbildung des Dorsalgefäßes (Klammer) (D). Vollständige Ablösung der Muskeln in Stadium 17 (F). Anti-GFP-Färbungen detektierten D-Arf2-T31N-EGFP im gesamten Zytoplasma der Muskeln (G' und G'').

Tabelle 3 Übersicht über Überexpressionsanalysen mit GDP- und GTP-gebundenen Varianten der Arfs

	FCs + FCMs (gesamtes Mesoderm St. 7-12) <i>twi</i> -Gal4	FCs + FCMs (gesamtes Mesoderm St. 11-15) <i>mef2</i> -Gal4	FCs (und wachsender Muskel) <i>rP298</i> -Gal4	FCMs (nach Fusion auch im wachsenden Muskel) <i>sns4,5</i> -Gal4	Nachweis des Konstruktes in wg- Domäne
<i>UAS-d-arf1-T31N</i>	vital	vital	vital	vital	<i>d-arf1 in situ</i>
<i>UAS-d-arf1-Q71L</i>	embryonal letal Fusionsdefekte Dorsalschlussdefekte	embryonal letal Fusionsdefekte Anheftungsdefekte	vital	vital	<i>d-arf1 in situ</i>
<i>UAS-d-arf2-Q71L</i>	vital	vital	vital	vital	<i>d-arf2 in situ</i>
<i>UAS-d-arf2-T31N-EGFP (J5)</i>	Semi-letal Anheftungsdefekte (35%)	Larval (L1) letal Anheftungsdefekte (100%)	Semi-letal	Semi-letal	anti-GFP
<i>UAS-d-arf2-Q71L-EGFP (J5)</i>	vital	vital	vital	vital	anti-GFP
<i>UAS-d-arf6-T27N</i>	vital	vital	vital	vital	<i>d-arf6 in situ</i>
<i>UAS-d-arf6-Q67L</i>	vital	vital	vital	vital	<i>d-arf6 in situ</i>

Blau: P-Transposase vermittelte Integration, Grün: ϕ C31-Integrase vermittelte Integration des UAS-Konstruktes
Vital bedeutet, dass keine Defekte in der Muskulatur beobachtet werden konnten und adulte Fliegen auftraten, ansonsten sind beobachteten Phänotypen aufgelistet. Die Funktionalität der UAS-Konstrukte wurde entweder mit *in situ*-Hybridisierungen oder anti-GFP-Antikörperfärbung überprüft (letzte Spalte).

Zusammenfassend unterstützen die Überexpressionsanalysen und das Rettungsexperiment mit der aktivierten Form der D-Arf6-GTPase nicht die Vorstellung, dass Schizo die Myoblastenfusion ausschließlich über die Aktivierung der D-Arf6-GTPase reguliert. Hingegen lassen Rettungsexperimente mit der aktivierten Form von D-Arf1 vermuten, dass Schizo den GDP/GTP-Zyklus der D-Arf1-GTPase reguliert. Die Überexpression von GTP-gebundenem D-Arf1 interferiert zudem mit der Entwicklung der Muskulatur, möglicherweise während der Einwanderung des Mesoderms, während der Fusion und zuletzt auch während der Anheftung der Muskeln an die überliegende Epidermis. Interessanterweise resultierte auch die mesodermale Überexpression von GDP-gebundenem D-Arf2 in Defekten in der Muskelanheftung. Jedoch konnte weder die Überexpression von GDP-gebundenem D-Arf1 noch von GDP-gebundenem D-Arf2 Fusionsdefekte erzielen. Im Folgenden soll daher einerseits die Funktion der D-Arf1-GTPase analysiert werden und andererseits mögliche Redundanzen zwischen den Arf-GTPasen aufgeklärt werden.

3.3.3. Der Verlust von zygotischem *d-arf1* resultiert nicht in Fusionsstörungen

3.3.3.1. Analyse von *d-arf1* Defizienzen und P-Element-Insertionen

Die Rettungsexperimente mit der aktivierten Form von D-Arf1 lassen vermuten, dass Schizo die Myoblastenfusion über die D-Arf1-GTPase fördert. Der Verlust von D-Arf1 sollte daher zu einem Fusionsdefekt führen. Das *d-arf1* Gen befindet sich auf dem linken Arm des 3. Chr. in der Region 80B1. Da zu dem Zeitpunkt dieser Arbeit keine Mutanten für *d-arf1* zur Verfügung standen, wurden zunächst die *d-arf1* Defizienz *Df(3L)ED5017* (zytologischer Bereich 80A4 bis 80C2) und die in der 5'UTR inserierte semi-letale P-Element Insertion *PBac{3HPy[]Arf79F^{C005}}* (im Folgenden als *Arf79F^{C005}* bezeichnet; Abb. 15) hinsichtlich Letalität und Muskeldefekten untersucht. Obwohl homozygot defiziente oder *Arf79F^{C005}/Df(3L)ED5017* transheterozygote Tiere letal sind (Tabelle 4), zeigen sie keine Defekte in der embryonalen Muskulatur (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Analysen kann bereits geschlussfolgert werden, dass der zygotische Verlust von *d-arf1* nicht in Fusionsdefekten resultiert.

3.3.3.2. P-Element-Mutagenese zur Erzeugung einer *d-arf1* Mutante

Da die Defizienz neben *d-arf1* 18 weitere Gene deletiert (Anhang Kap. 8.1.1) und es nicht sicher ist, ob es sich bei der P-Element Insertion *Arf79F^{C005}* um ein Null-Allel handelt, wurde die Generierung einer spezifischen Deletionsmutante für *d-arf1* angestrebt. Für die P-Element-Exzisionsmutagenese (Kap 5.2.7) wurde das P-Element *P{EPgy2}Arf79F^{EY08473}* benutzt (Abb. 15), welches ein Gen für die rote Augenfarbe als phänotypischen Marker enthält und homozygot lebensfähig ist. Während der Exzisionsmutagenese wurde das Herausspringen des P-Elements durch den Verlust der roten Augenfarbe verfolgt. Insgesamt wurden 86 weißäugige Fliegenstämme etabliert (Tabelle 4). Unter diesen Linien befanden sich vier Linien (*d-arf1Δ1-4*), die Letalität in Transheterozygose zu der *d-arf1* Defizienz *Df(3L)ED5017* aufweisen. Interessanterweise zeigt der Fliegenstamm *d-arf1Δ4* Letalität in Transheterozygose zu der P-Element Insertion *Arf79F^{C005}*. Dies deutet darauf hin, dass die Letalität in dieser Linie durch eine chromosomale Veränderungen in der Region des *d-arf1* Gens hervorgerufen ist und *d-arf1Δ4* somit ein putatives Allel für *d-arf1* darstellt. Die molekulare Analyse dieser Linie hat jedoch ergeben, dass die kodierende Region von *d-arf1*, sowie die 5'UTRs größtenteils nicht deletiert wurden (Abb. 15). Es konnte bisher jedoch kein PCR Produkt über den ursprünglichen Insertionsort des P-Elementes amplifiziert werden. Einerseits könnte dies darauf hindeuten, dass Reste des P-Elements zurückgeblieben sind. Diese können möglicherweise mit der Regulation der Genexpression interferieren und somit einen dominanten Effekt bewirken, welcher die Letalität hervorruft. Die direkt benachbarte P-Insertion *Arf79F^{C005}* ist zudem als semi-letale P-Element-Insertion klassifiziert, was daraufhinweisen könnte, dass Insertionen in dieser Region einen letalen Effekt auslösen. Andererseits existiert die Möglichkeit, dass durch das Herausspringen des P-Elementes regulatorische Regionen direkt benachbarter Gene betroffen wurden, und somit Letalität hervorrufen. Zu dem derzeitigen

Standpunkt ist es nicht eindeutig klar, ob es sich bei Fliegenstamm *d-arf1Δ4* um ein mutantes Allel für *d-arf1* handelt. Antikörperfärbungen mit einem spezifischen anti-Arf1-Antikörper könnten in Zukunft aufzeigen, ob Expression von D-Arf1 in dieser Linie runterreguliert ist. Die phänotypische Auswertung dieser Linie hat gezeigt, dass *d-arf1Δ4* sowohl in homozygoter Situation, als auch in Transheterozygose zu der Defizienz *Df(3L)ED5017* oder der semi-letalen P-Element Insertion *Arf79F^{C005}* keine Defekte in der Muskulatur bewirkt (Daten nicht gezeigt).

Parks et al. (2004) haben mit Hilfe der FLP-vermittelten Rekombination eine kleine Deletion *Df(3L)Exel6139* (Bereich 80B1-80C2) erzeugt, die zwar letal gegen die Defizienz *Df(3L)ED5017* ist, es treten aber auch homozygote defiziente *Df(3L)Exel6139* Fliegen auf (*Exel6139* ist jedoch nicht mehr verfügbar). Dies bedeutet, dass der alleinige Verlust von *d-arf1* nicht zur Letalität führen kann. Aus diesem Grund wurden auch die vitalen Exzisionslinien molekular untersucht. Unter diesen befanden sich einige Linien, in denen zwar kleinere Bereiche in der Nähe des ursprünglichen P-Element-Insertionsortes (Abb. 15), jedoch nicht die kodierende Region von *d-arf1* deletiert wurde. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich nicht um Mutanten von *d-arf1*.

Tabelle 4 Auswertung der Exzisionsmutagenese - Letalitätstestkreuzungen

Allel			<i>Df(3R)ED5017</i>	<i>Arf79F^{C005}</i>
<i>Df(3L)ED5017</i>			letal	letal
<i>Df(3L)Exel6139</i> (Parks et al., 2004)			vital	Nicht bekannt
<i>Arf79^{C005}</i>			letal	Semi-letal
<i>Arf79^{EY08473}</i>			vital	vital
86 "Jump-Out" Linien	43 homozygot vitale Linien	<i>d-arf1v1-43</i>	vital	vital
	43 homozygot letale Linien	<i>d-arf1Δ1</i>	letal	vital
		<i>d-arf1Δ2</i>	letal	vital
		<i>d-arf1Δ4</i>	letal	letal
		<i>let 5-43</i>	vital	vital

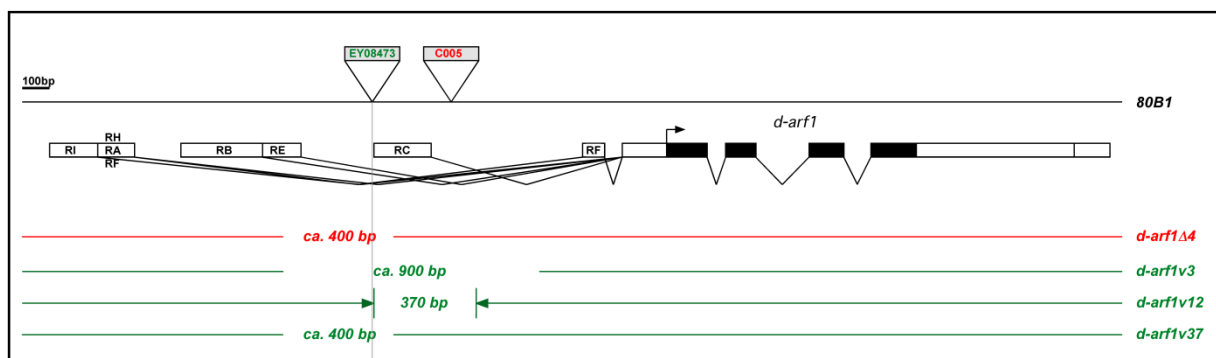


Abb. 15 Genomische Region des *d-arf1* Gens und Charakterisierung der putativen Exzisionsmutanten

Das *d-arf1* Gen befindet sich auf dem 3. Chr. bei der zytologischen Position 80B1. Für *d-arf1* werden mehrere Transkripte vorhergesagt (RA, RB, RC, RE, RF, RH, RI Flybase Release 5.1), die sich in den 5'UTRs unterscheiden, während die 3'UTR gemeinsam genutzt wird. UTRs sind als weiße Kästchen dargestellt, die Exons als schwarze Kästchen. Die Dreiecke repräsentieren die Lokalisation der P-Elemente: *Arf79F^{EY08473}* ist 1100 bp und *Arf79F^{C005}* 800 bp 5' von dem Translationsstart (Pfeil) integriert. Vitale Allele sind in grün, letale Allele in rot dargestellt. Auswertung der *d-arf1* Exzisionsmutanten: Für die vitalen Linien *d-arf1v3*, *d-arf1v12* und *d-arf1v37* konnten kleinere Deletionen im Bereich der 5'UTRs näher bestimmt werden. Für die letale Linie *d-arf1Δ4* konnte ein Bereich von 400 bp nicht mehr nachgewiesen werden, jedoch konnte nicht genau bestimmt werden, ob Reste des P-Elements vorhanden sind. Die kodierende Region des *d-arf1* Gens wurde in keiner der Linien deletiert.

Aufgrunddessen, dass bei dieser P-Element-Mutagenese keine Linien generiert werden konnten, von denen eindeutig bewiesen ist, dass es sich um Nullmutanten für *d-arf1* handelt, wurde für die weiteren Experimente die *d-arf1* Defizienz *Df(3L)ED5017* verwendet.

3.3.3.3. Maternal bereitgestellte *d-arf1* mRNA ist bis zum Ende der Embryogenese nachweisbar

Die mRNA von *d-arf1* konnte bereits früh im synzytialen Blastoderm Stadium nachgewiesen werden (Kap. 3.3.1). Viele der maternal bereitgestellten mRNAs bleiben bis zum Ende der Embryonalentwicklung bestehen und können damit den Ausfall an zygotischer Genexpression ersetzen. Möglicherweise könnte dies erklären, wieso die Defizienzen für *d-arf1* keinen Phänotyp aufweisen. Um festzustellen, wie lange die maternale Komponente von *d-arf1* anhält, wurden daher *in situ*-Hybridisierungen mit einer *d-arf1* spezifischen RNA Sonde an der *d-arf1* Defizienz *Df(3L)ED5017* durchgeführt. Dabei konnte *d-arf1* mRNA in homozygoten defizienten Embryonen bis zum Ende der Embryogenese nachgewiesen werden (Abb. 16). Um die maternale Komponente von Genen zu eliminieren werden in der Regel sogenannte Keimbahnklone hergestellt, in denen durch FLP/FRT vermittelte Rekombination homozygote mutante Klone in der Keimbahn hergestellt werden (Chou & Perrimon, 1996). Nachkommen von Weibchen dieses Genotyps weisen schließlich keine maternal bereitgestellte mRNA auf. Für die Erzeugung von Keimbahnklonen wird eine FRT-Insertion benötigt, welche möglichst nah am Centromer liegt, so dass sich die zu untersuchende Mutation distal von der FRT-Insertion befindet. Da sich das *d-arf1* Gen jedoch bereits in direkter Nähe zum Heterochromatin-Bereich des Centromers befindet, gibt es keine verfügbare FRT-Insertion, welche Keimbahnklone im Falle von *d-arf1* ermöglichen. Somit kann lediglich vermutet werden, dass das maternal bereitgestellte *d-arf1* den Verlust des zygotischen *d-arf1* ersetzt und daher keine Phänotypen zu beobachten sind.

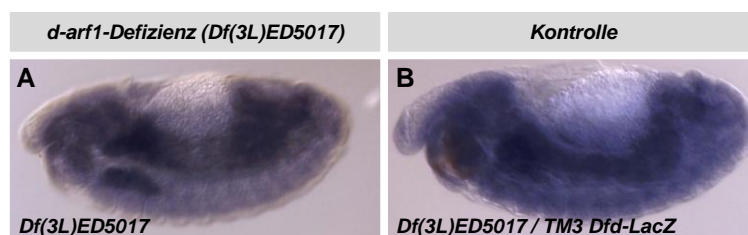


Abb. 16 Maternal bereitgestellte *d-arf1* mRNA ist bis zum Ende der Embryogenese nachweisbar

In situ-Hybridisierungen mit einer *d-arf1* spezifischen RNA Sonde. *d-arf1* mRNA ist in homozygoten *d-arf1* defizienten Embryonen (A, *Df(3L)ED5017*), in denen keine

zygotische mRNA Transkription stattfindet, ähnlich wie in den heterozygoten Kontroll-Embryonen (B, *Df(3L)ED5017/TM3 Dfd-LacZ*) während den fusionsrelevanten Stadien (St. 14) detektierbar.

3.3.4. Epistasisexperimente zur Aufklärung der genetischen Interaktion zwischen *schizo*, *d-arf1* und *d-arf6*

3.3.4.1. Die Herstellung von *schizo*, *d-arf1* Doppelmutanten zur Durchführung von Gendosisexperimenten ist nicht möglich

Eine weitere Möglichkeit, eine Relevanz des *d-arf1* Gens für die Myoblastenfusion zu überprüfen, ist die Durchführung für Gendosisexperimente. Unter der Annahme, dass Schizo in der Aktivierung von D-Arf1 involviert ist, sollte die Herausnahme einer Kopie von *schizo* im *d-arf1*-defizienten Hintergrund einen Myoblastenfusionsphänotyp erzielen. Für dieses Experiment benötigt man *schizo*, *d-arf1* Doppelmutanten, die durch meiotische Rekombination erzeugt werden müssen. Aufgrund der zytologischen Lage von *schizo* (78B1) und *d-arf1* (Defizienz *Df(3L)ED5017*, 80A4-80C2) liegt die theoretische Rekombinationsfrequenz jedoch unter 1%. Zudem befindet sich das *d-arf1* Gen bereits im Centromer-nahen Heterochromatin-Bereich, was zusätzlich die Rekombinationsfrequenz herabsetzt. Trotzdem wurde die Generierung einer *schizo*^{CI-28}, *Df(3L)ED5017* Rekombinante angestrebt (Kap. 5.2.6). Insgesamt wurden 450 rotäugige, putative rekombinante Fliegenstämme etabliert und hinsichtlich Letalität gegen das *schizo*^{U112} Allel und die *d-arf1* Defizienz getestet. Es konnte jedoch kein Fliegenstamm identifiziert werden, der Letalität in Transheterozygose zu beiden Allelen zeigt. Somit ist es nicht möglich, eine *schizo*, *d-arf1* Doppelmutante herzustellen und eine genetische Interaktion zwischen *schizo* und *d-arf1* zu untersuchen.

3.3.4.2. *schizo* und *d-arf6* zeigen keine genetische Interaktion

Um herauszufinden, ob *schizo* genetisch mit *d-arf6* interagiert, wurden Dosis-sensitive Interaktionstest durchgeführt. Sollte Schizo in der Aktivierung von D-Arf6 fungieren, sollte die Reduktion der Gendosis von *schizo* in homozygoten *d-arf6*¹ Mutanten einen Fusionsphänotyp hervorrufen. Für dieses Experiment wurden die *d-arf6*¹ Deletionsmutante aus Dyer et al. (2007) verwendet, welche homozygot keinen Fusionsdefekt zeigen. Die zusätzliche Herausnahme einer Kopie von *schizo* aus homozygoten *d-arf6*¹ Mutanten resultierte jedoch nicht in einem Fusionsdefekt (Daten nicht gezeigt). Es findet also keine genetische Interaktion zwischen *schizo* und *d-arf6* statt. Dieses Resultat weist weiterhin darauf hin, dass Schizo nicht in der Aktivierung der D-Arf6 GTPase involviert ist.

3.3.4.3. D-Arf1 und D-Arf6 agieren nicht in funktioneller Redundanz

Neben der maternalen Komponente besteht weiterhin die Möglichkeit, dass D-Arf1 während der Muskelentwicklung in funktioneller Redundanz mit einem anderen Arf-Protein wirkt. Sowohl *d-arf2*, als auch *d-arf6* zeigen eine ubiquitäre Expression während der gesamten Embryogenese (Abb. 10) und kommen somit als potentielle Redundanzpartner für D-Arf1 in Frage. Um eine mögliche funktionelle Redundanz zwischen D-Arf1 und D-Arf6 aufzuklären, wurden *d-arf6*¹; *Df(3L)ED5017* Doppelmutanten hergestellt. Die phänotypische Analyse der embryonalen Muskulatur der

Doppelmutanten hat ergeben, dass der gleichzeitige Verlust von zygotischen *d-arf1* und *d-arf6* zu keinen Fusionsstörungen führt (Abb. 17). Auch die mesodermale Koexpression von GDP-gebundenen, inaktiven D-Arf1 und D-Arf6 (UAS-*d-arf1-T31N* + UAS-*d-arf6-T27N*) mit Hilfe von *twi*-Gal4 hatte keinen negativen Einfluss auf die Muskelentwicklung (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde Gebrauch von UAS-RNAi-Konstrukten gemacht, welche aus kurzen, als invertierte Wiederholungen angeordneten Gensequenzen bestehen und eine konditionelle Inaktivierung der Genfunktion bewirken sollen (Dietzl et al., 2007). Die phänotypische Analyse der Muskulatur hat jedoch ergeben, dass weder die mesodermale Überexpression von *d-arf1* RNAi, von *d-arf6* RNAi noch die Koexpression von *d-arf1* und *d-arf6* RNAi Konstrukten in Fusionsstörungen resultierte (Daten nicht gezeigt).

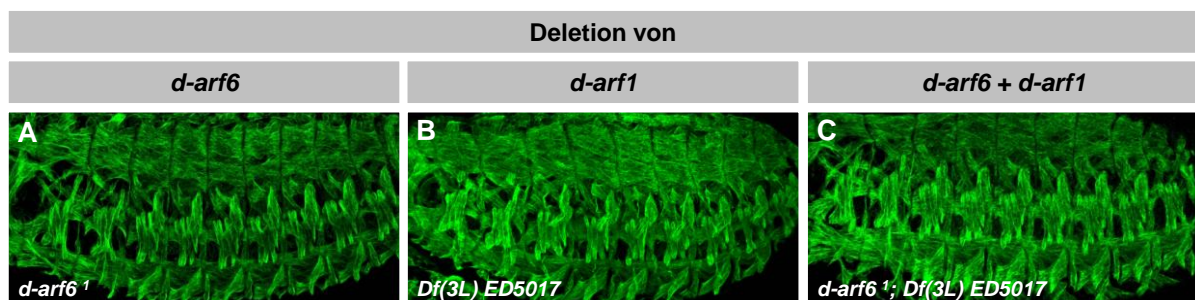


Abb. 17 D-Arf1 und D-Arf6 agieren nicht in funktioneller Redundanz während der Myoblastenfusion

β3-Tubulin-Antikörperfärbung an Stadium 16 Embryonen. Anterior ist links, dorsal ist oben.

Homozygote *d-arf6*¹ Mutanten (A), homozygote Embryonen der *d-arf1* Defizienz *Df(3L)ED5017* (B) und Embryonen in denen *d-arf6* als auch *d-arf1* deletiert sind (*d-arf6*¹; *Df(3L)ED5017*; C) zeigen keine Defekte in der larvalen Muskulatur.

Diese Experimente weisen eindeutig darauf hin, dass D-Arf1 nicht in funktioneller Redundanz mit D-Arf6 agiert. Eine mögliche Redundanz mit D-Arf2 konnte bisher nicht überprüft werden, da für *d-arf2* keine Mutanten existieren und das Einkreuzen des UAS-*d-arf2-T31N*-Konstruktes, welches die Überexpression eines GDP-gebundenen, inaktiven D-Arf2 ermöglicht, aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich war.

3.3.5. Schizo interagiert im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit der GDP-gebundenen Form von D-Arf1

Die Rettungsexperimente mit der aktivierten Form von D-Arf1 indizieren, dass der Sec7-Domänen-haltige Arf-GEF Schizo *in vivo* über die Aktivierung von D-Arf1 wirkt. Sec7-Domänen bilden eine planare Plattform, die nach Bindung von GDP-gebundenem Arf die Dissoziation des GDPs katalysieren und die Anlagerung von GTP erlauben, so dass der resultierende Arf-GTP-Komplex freigesetzt werden kann (Goldberg et al., 1998, Mossessova et al., 2003, Renault et al., 2003). Eine physikalische Interaktion des Arf-GEFs Schizo mit den *Drosophila* Arf-GTPasen wurde mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems (Kap. 5.5.5) untersucht. Um zu überprüfen, ob die Interaktion von dem Nukleotidbindungszustand der Arf-GTPase abhängt, wurden dabei die Arf-GTPase jeweils in der GTP-restituierten Q-L als auch in der GDP-restituierten T-N Variante eingesetzt. Interessanterweise konnte in 3 von 4 Versuchen ausschließlich eine Interaktion zwischen dem vollständigen Schizo Protein (Isoform SchizoP2 Kap. 3.1.2; 1313 AS, Abb. 18A) und der GDP-gebundenen Form von D-Arf1 festgestellt werden (BD_Schizo-fl, AD_D-Arf1-T31N, Abb. 18B-2), während keine Interaktion zwischen Schizo-fl und der GTP-gebundenen Form von D-Arf1, der GDP- oder GTP-gebundenen Form von D-Arf2 oder D-Arf6 beobachtet wurde (Abb. 18). Dies zeigt, dass Schizo spezifisch mit der GDP-gebundenen Form von D-Arf1 interagiert.

Um die Spezifität der Sec7-Domäne zu verifizieren, wurde zudem ein kürzeres Schizo-Fragment (SchizoSec7PH, 338 AS, Abb. 6; Abb. 18A) für den Interaktionstest verwendet, welches ausschließlich die katalytische Sec7-Domäne als auch die stimulierende PH-Domäne enthält. Dabei konnte in 2 von 3 Versuchen eine Interaktion zwischen dem SchizoSec7PH-Fragment mit der GDP- als auch der GTP-gebundenen Form von D-Arf1 (AD_SchizoSec7PH, BD_D-Arf1-T31N, BD_D-Arf1-Q71L, Abb. 18D-2, D-3), sowie eine schwächere Interaktion mit der GTP-gebundenen Form von D-Arf2 beobachtet werden (BD_D-Arf2-Q71L, Abb. 18D-5). Diese Daten weisen weiterhin daraufhin, dass Schizo vermutlich über die Sec7-Domäne mit D-Arf1 interagiert. Insgesamt betrachtet sollte an dieser Stelle allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Resultate bei Verwendung des AD_SchizoSec7PH-Fragmentes generell sehr variabel ausgefallen sind und daher nur eingeschränkt in die Wertung mit einbezogen werden sollten. Die PH-Domäne übt *in vivo* einen stimulatorischen Effekt auf die GEF-Aktivität aus, in dem es über die Bindung an Plasmamembran lokalisiertes PIP₂ eine Konzentrierung von Arf-GEF und Arf Protein bewirkt (Paris et al., 1997). Die dominante Anwesenheit der PH-Domäne in dem kurzen SchizoSec7PH-Fragment, könnte eine Misslokalisierung in den Hefezellen bewirken und somit eine für den Interaktionstest notwendige Translokation in den Zellkern verhindern. Um die Spezifität der Sec7-Domäne zu verifizieren, sollte daher der Interaktionstest mit einem Fragment wiederholt werden, welches ausschließlich die den GDP-GTP-Austausch vermittelnde Sec7-Domäne enthält.

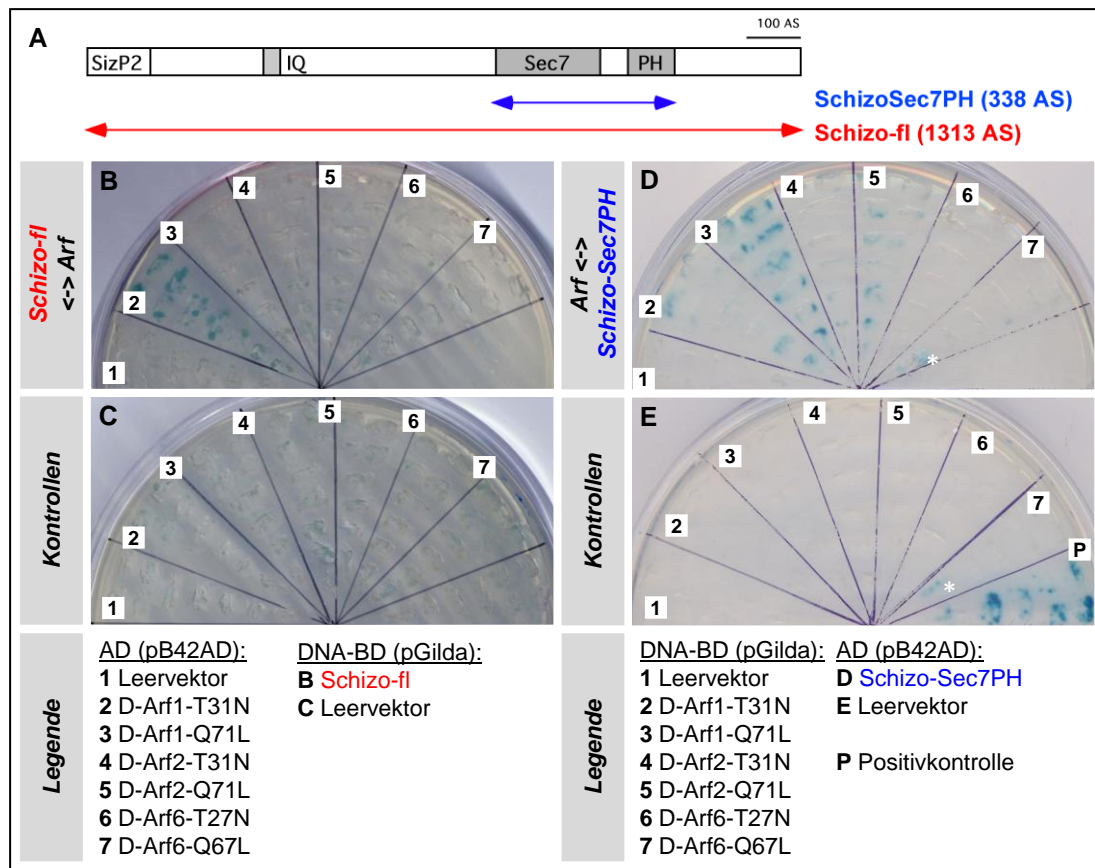


Abb. 18 Schizo interagiert mit der GDP-gebundenen Form von D-Arf1

(A) Schema des SchizoP2 Proteins und der Varianten, die für den Interaktionstest eingesetzt wurden. Das Schema zeigt den SchizoP2 spezifischen N-Terminus (SizP2) und die funktionellen Domänen von Schizo: IQ-Domäne (IQ), katalytische Sec7-Domäne (Sec7) und Phosphoinositid-bindende PH-Domäne (PH). Darunter sind die für den Hefe-Zwei-Hybrid-Test eingesetzten Fragmente markiert: das 1313 AS große vollständige Schizo-Protein (**Schizo-fl**) und das 338 AS große SchizoSec7PH-Fragment (**SchizoSec7PH**), welches nur die Sec7- und die PH-Domäne beinhaltet (AS 451-789). (B-E) Exemplarische Aufnahmen des Interaktionstest. Gezeigt sind jeweils 8 Hefe-Kotransformanten nach drei Tagen Inkubation auf Galaktose und X-Gal-haltigen Induktionsplatten. Interaktion der zu testenden Protein wird durch Wachstum und Blaufärbung angezeigt. Kombinationen aus DNA-Bindungsdomäne (BD)-Fusionsprotein und Aktivierungsdomäne (AD)-Fusionsprotein sind in der Legende angegeben. (B) Interaktion konnte nur zwischen Schizo-fl und der GDP-gebundenen Form von D-Arf1 (BD_SchizoFl +AD_D-Arf1-T31N, B-2) festgestellt werden, jedoch nicht in den Negativkontrollen mit dem leeren Vektor (C).

(D) Interaktion konnte zwischen AD_SchizoSec7PH und BD_D-Arf1-T31N, sowie BD_D-Arf1-Q71L (D-2, D-3) und nach längerer Inkubation mit BD_D-Arf2-Q71L (D-4) beobachtet werden. Die mit * gekennzeichnete Blaufärbung bei BD_D-Arf6-Q67L (7) tritt sowohl mit AD_SchizoSec7PH (D) als auch mit dem leeren Vektor auf (E). (E) Negativkontrollen mit entgegengesetzten leeren Vektor. P entspricht der Positivkontrolle zwischen der BD_Duf-Intra und AD_Rols-RI (Diplomarbeit Nina Reichart, 2004).

3.3.6. Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von Schizo in COS7-Zellen

Einige Studien konnten bereits darlegen, wie die Interaktion der katalytischen Sec7-Domäne mit den Arf-GTPasen auf molekularen Level erfolgt (Goldberg et al., 1998, Mossessova et al., 1998), jedoch ist nicht genau bekannt wie die Spezifität der Sec7-GEFs für eine bestimmte Unterfamilie der Arf-GTPasen gewährleistet wird. Es wird jedoch vermutet, dass die in der Nähe der Sec7-Domäne

befindlichen Sequenzen in der Determination der Substratspezifität involviert sind, und zwar entweder direkt, oder durch die Rekrutierung des Arf-GEFs an distinkte intrazellulären Membranen. Um weitere Hinweise über die Funktion des Arf-GEFs Schizo zu erlangen, wurden daher in Kooperation mit der AG Jacob (Ksenia Astanina, Dr. Alexandra Elli, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg) Ko-Lokalisationsstudien in COS-Zellen durchgeführt, die sich aufgrund ihrer Größe und der flachen Ausbreitung gut für die Lokalisationsbestimmung an intrazellulären Kompartimenten eignen. Dazu wurde der vollständige Leserahmen von SchizoP2 (Abb. 6; Abb. 18A), sowie die Arf-GTPasen in der Q->L Variante als auch in der T->N Variante in die Expressionsvektoren pCFP-C1 bzw. pYFP-C1 kloniert, so dass N-terminale Fusionsproteine mit Cyan-Fluoreszierendem Protein (CFP) bzw. Yellow-Fluoreszierendem Protein (YFP) entstehen. COS-Zellen wurden mit dem ER-Marker Ds-Red2-ER, CFP-Schizofl und YFP-D-Arf1 (T31N oder Q71L), YFP-D-Arf2 (T31N oder Q71L) oder YFP-D-Arf6 (T27N oder Q67L) ko-transfiziert, 48 Stunden nach der Transfektion fixiert und mittels Konfokal-Fluoreszenz Mikroskopie untersucht. An dieser Stelle können bisher nur vorläufige Resultate beschrieben werden. CFP-Schizofl konnte vor allem im perinukleären Bereich und in vesikulären Strukturen detektiert werden (Abb. 19). Dabei variierte die Größe und Anzahl der CFP-Schizofl-positiven Strukturen zwischen wenigen, größeren Strukturen oder Aggregaten bis hin zu ca. 100 kleinen Vesikeln pro Zelle. Das Endoplasmatische Retikulum konnte als mögliches zelluläres Kompartiment ausgeschlossen werden (Abb. 19). GTP-gebundenes, konstitutiv-aktives YFP-D-Arf1-Q71L oder YFP-D-Arf2-Q71L konnte in dickeren Strukturen in der perinukleären Region, eventuell in der Nähe des Golgis (Daten nicht gezeigt), detektiert werden, während GDP-gebundenes, inaktives YFP-D-Arf1-T31N oder YFP-D-Arf2-T31N eher zytoplasmatisch vorlag und nicht mit intrazellulären Vesikeln assoziiert zu sein schien (Abb. 19B, D). YFP-D-Arf1-Q71L-positive Strukturen zeigten in wenigen Zellen eine partielle Überlappung mit CFP-Schizofl (Pfeil, Abb. 19A). Zudem konnte eine nahezu komplette Kolokalisation von CFP-Schizofl mit YFP-D-Arf2-Q71L-positive Strukturen beobachtet werden, die auffällig vergrößert waren (Pfeil, Abb. 19C). Zu dem derzeitigen Standpunkt ist jedoch nicht eindeutig klar, ob es sich hierbei um eine echte Kolokalisation oder nur um falsch-positive Überlagerung der detektierten Fluoreszenzemission handelt. Für D-Arf6 konnte nach Einzeltransfektion sowohl für die GTP- als auch für die GDP-gebundene Form eine Lokalisation in kleinen vesikulären Strukturen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). YFP-D-Arf6-T27N positive Vesikel, die im Vergleich zu CFP-Schizofl positiven Vesikeln kleiner und nahezu über die ganze Zelle verteilt sind, zeigten keine Kolokalisation mit CFP-Schizofl (Abb. 19F). Jedoch konnte in einer geringen Prozentzahl beobachtet werden, dass CFP-Schizofl und YFP-D-Arf6-T27N positive Vesikel nahe beieinanderliegen, aber nicht überlappen (Pfeilkopf, Abb. 19F).

YFP-D-Arf1, YFP-D-Arf2, und zu einem gewissen Grad YFP-D-Arf6-Q67L zeigten eine zum Teil starke zytoplasmatische Komponente und ein Signal im Zellkern, was für die Säugerhomologe bisher nicht bekannt ist. Zudem konnten bisher teilweise nur sehr wenige ko-transfizierte Zellen analysiert

werden, in denen eine vesikuläre Struktur der YFP-Arf Protein vorlag. Es besteht die Möglichkeit, dass das N-terminal angehängte YFP mit der Freisetzung der für D-Arf-GTPasen charakteristischen N-terminalen Helix interferiert und somit einen negativen Einfluss auf die Membranlokalisation der YFP-D-Arf Proteine ausübt. Eine mögliche Kolo-kalisation sollte daher zwischen D-Arf-YFP Proteinen (C-terminaler Anhang) und CFP-Schizofl analysiert werden und der prozentuale Anteil anhand von einer größeren Anzahl an ko-transfizierten Zellen statistisch verifiziert werden.

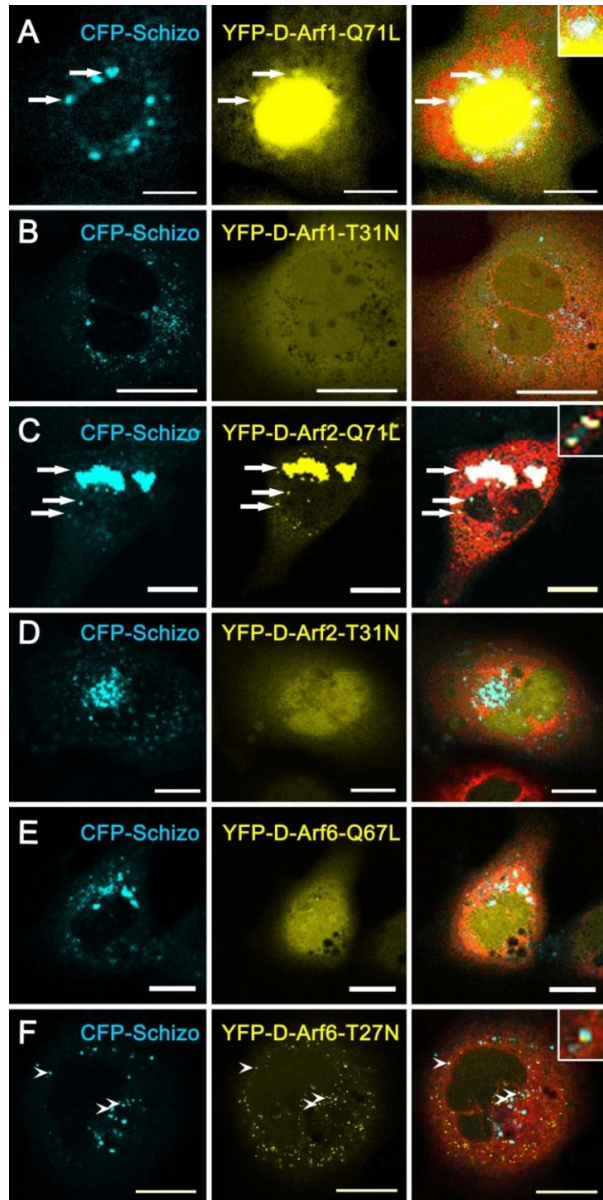


Abb. 19 Expression CFP-Schizofl und YFP-D-Arf1-Q71L, YFP-D-Arf1-T31N, YFP-D-Arf2-Q71L, YFP-D-Arf2-T31N, YFP-D-Arf6-Q67L und YFP-D-Arf6-T27N in transient transfizierten COS Zellen
COS-Zellen wurden mit Ds-Red2-ER als Marker für das Endoplasmatische Retikulum (rot), CFP-Schizofl und YFP-D-Arf1-Q71L (A), YFP-D-Arf1-T31N (B), YFP-D-Arf2-Q71L (C), YFP-D-Arf2-T31N (D), YFP-D-Arf6-Q67L (E) bzw. YFP-D-Arf6-T27N (F) transient ko-transfiziert, 48 Stunden später fixiert und mittels Konfokal-Mikroskopie analysiert. CFP-Schizofl zeigt eine perinukleäre Lokalisation in vesikulären Strukturen (A, B, D-F) und größeren Aggregaten. Pfeile heben mögliche ko-lokalisierte Strukturen zwischen CFP-Schizofl und YFP-D-Arf1-Q71L (A) oder YFP-D-Arf2-Q71L (C) vor (siehe Vergrößerung). Pfeilköpfe zeigen auf sich nicht überlappende, aber in enger Nähe befindlichen CFP-Schizofl und YFP-D-Arf6-T27N positive, vesikuläre Strukturen (F) (siehe Vergrößerung).

3.3.7. Übersicht über die Analysen zur Funktion des Arf-GEFs Schizo in der Aktivierung der Arf-GTPasen während der Myoblastenfusion von *Drosophila melanogaster*

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen, um die Funktion des Arf-GEFs Schizo und der Arf-GTPasen aufzuklären, sind in der folgenden Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5 Übersicht über die Analysen zur Funktion von Arf-GTPasen während der Myoblastenfusion

	D-Arf1	D-Arf6	D-Arf1 + D-Arf6	D-Arf2
mRNA Expression	ubiquitär	ubiquitär	---	ubiquitär
Rettung von <i>schizo</i> ^{CI-28} mit Arf-GTP	Partielle Rettung	Keine Rettung	---	In Arbeit
Ektopische Überexpression				Anheftungsdefekte
- D-Arf-GDP (T-N)	Kein Pt	Kein Pt	Kein Pt	
- D-Arf-GTP (Q-L)	Fusionsdefekte Anheftungsdefekte	Kein Pt	---	Kein Pt
- RNAi	Kein Pt	Kein Pt	Kein Pt	Kein Pt
Analyse von Deletionsmutanten:	- <i>Df(3L)ED5017</i> (- <i>d-arf1Δ4</i>)	- <i>d-arf6^l</i> Kein Pt	<i>d-arf6^l</i> ; <i>Df(3L)ED5017</i>	Nicht möglich
- zygotischer Genverlust	Kein Pt	(Dyer et al., 2007)	Kein Pt	
- maternaler + zygotischer Genverlust	Nicht möglich	kein Pt (Dyer et al., 2007)	Nicht möglich	Nicht möglich
Gendosisexperimente mit <i>schizo</i> ^{CI-28}	Nicht möglich	Kein Effekt	---	Nicht möglich
Interaktion mit Schizo im Hefe-Zwei-Hybrid-System	- Schizofl + D-Arf1-GDP (D-Arf1-GDP + SchizoSec7PH -D-Arf1-GTP+ SchizoSec7PH)	Keine Interaktion	---	(D-Arf2-GTP + SchizoSec7PH)

Im Gegensatz zu Chen et al. (2003) konnte durch die Überexpression der GDP- oder GTP gebundenen Formen von D-Arf6 keine Fusionsdefekte induziert werden. Rettungsexperimente, genetische und biochemische Interaktionstest konnten zudem keine Interaktion zwischen Schizo und D-Arf6 feststellen. Diese Experimente und die Funktionsverluststudien von Dyer et al. (2007) argumentieren gegen eine Funktion von D-Arf6 in der Myoblastenfusion. Eine mögliche redundante Funktion von D-Arf6 mit D-Arf1 konnte zudem ausgeschlossen werden.

Die Tatsache, dass GTP-gebundenes D-Arf1 eine partielle Rettung des *schizo* induzierten Fusionsphänotyps erreicht, sowie die im Hefe-Zwei-Hybrid-System beobachtete Interaktion zwischen Schizo und D-Arf1-GDP deutet auf eine Funktion von Schizo in der Aktivierung von D-Arf1 hin. Zygotischer Verlust von *d-arf1* resultiert jedoch nicht in Fusionsdefekten. Es besteht die Möglichkeit, dass die maternal bereitgestellte mRNA von *d-arf1* den zygotischen Verlust von *d-arf1* ersetzen kann. Andererseits existiert die Möglichkeit, dass D-Arf1 in Redundanz mit D-Arf2 wirkt. Weitere Studien sind in Arbeit, um dies aufzuklären.

3.4. Untersuchungen zur Funktion von Schizo in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts

3.4.1. *schizo* und *rac1* zeigen keine genetische Interaktion

Chen et al. (2003) haben postuliert, dass die Rac-GTPase in homozygot *schizo* mutanten Embryonen in den Myoblasten misslokalisiert ist. Um aufzuklären, ob Rac1 tatsächlich in einer Signalkaskade mit Schizo wirkt, wurden dosis-sensitive genetische Interaktionsstudien durchgeführt. Für diese Experimente wurde einerseits das Funktionsverlustallel *rac1^{J11}* verwendet, bei dem es sich um eine EMS-induzierte Punktmutation G60E handelt, welche die Bindung von GTP verhindert (Ng et al., 2002). Andererseits wurde die P-Element Insertion *P{EPgy2}Rac1^{EY05848}* (im Folgenden *rac1^{EY05848}*) benutzt, die im 5'UTR Bereich des *rac1* Gens inseriert ist und als hypomorphes Allel für *rac1* beschrieben wurde (He et al., 2005). Aufgrund der Tatsache, dass *rac1* in funktioneller Redundanz mit *rac2* fungiert (Hakeda-Suzuki et al., 2002), zeigen sowohl *rac1^{J11}* mutante Embryonen (Abb. 20A) als auch *rac1^{EY05848}* mutante Embryonen (Abb. 20C) keine Defekte in der embryonalen Körperwandmuskulatur. Im Falle einer genetischen Interaktion zwischen *schizo* und *rac1*, sollte die Herausnahme einer Kopie von *schizo* eine Verstärkung des Muskelphänotyps im Vergleich zu den Einzelmutanten führen. Um dies zu analysieren, wurden *rac1^{J11}*, *schizo^{C1-28}* und *rac1^{EY05848}*, *schizo^{C1-28}* Doppelmutanten mit Hilfe von meiotischer Rekombination (Kap. 5.2.6.) generiert. Die phänotypische Analyse der somatischen Muskulatur hat ergeben, dass die Herausnahme einer Kopie von *schizo* bei beiden Allelen zu keinem veränderten Muskelphänotyp führt (Abb. 20B, D). Dies zeigt, dass *rac1* und *schizo* während der Myoblastenfusion nicht genetisch interagieren.

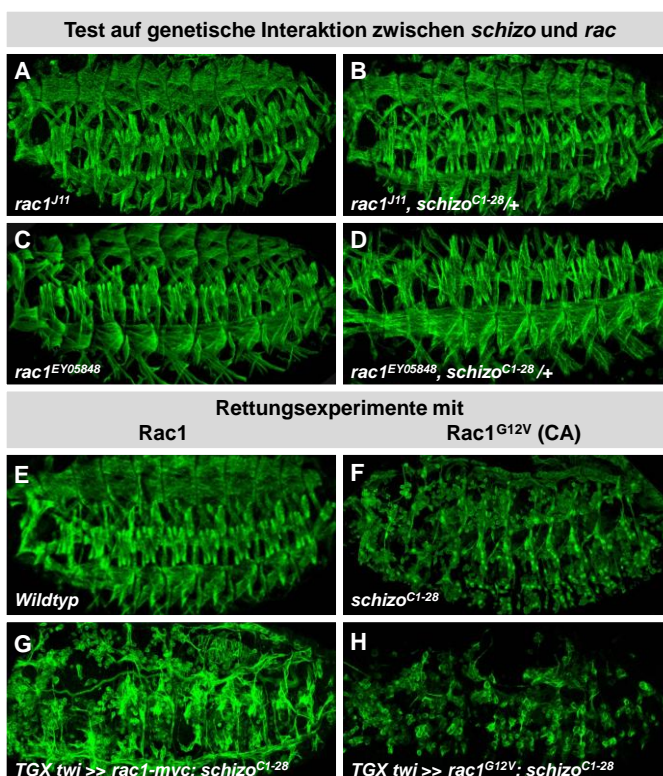


Abb. 20 *schizo* interagiert genetisch nicht mit *rac1* und *schizo^{C1-28}* mutanten Embryonen und können durch die Überexpression der Rac1-GTPase nicht gerettet werden

β3-Tubulin-Antikörperfärbung an Stadium 15/16 Embryonen. Anterior ist links, dorsal ist oben, laterale Ansicht. Homozygote *rac1^{J11}* (A) und *rac1^{EY05848}* Mutanten (C) zeigen keine Fusionsdefekte. Die Herausnahme einer Kopie von *schizo* führt zu keiner Verstärkung des Phänotyps (B, D). Wildtypischer Embryo (E). Fusionsphänotyp von homozygoten *schizo^{C1-28}* Mutanten (F). Auch nach mesodermaler Überexpression von wildtypischem Rac1 (UAS-*rac1-myc*) im *schizo^{C1-28}* mutanten Hintergrund zeigt sich der für *schizo^{C1-28}* charakteristische Fusionsphänotyp (G). Überexpression von konstitutiv-aktiven Rac1 (UAS-*rac1^{G12V}*) im Mesoderm im *schizo^{C1-28}* mutanten Hintergrund, ist nicht in der Lage, die Bildung von mehrkernigen Muskeln einzuleiten, führt jedoch zu Dorsalschlussproblemen und Entwicklungsstörungen der Embryonen (H).

3.4.2. Der *schizo*^{C1-28} Myoblastenfusionsphänotyp lässt sich durch die Überexpression von wildtypischen oder konstitutiv-aktiven Rac1 nicht retten und frühe mesodermale Expression von Rac1^{G12V} führt zu Myogenese-Defekten

Um weiterhin zu analysieren, ob Rac1 eine stromabwärts-liegende Komponente von Schizo ist, wurden Rettungsexperimente mit wildtypischen Rac1 (UAS-*rac1myc*) vorgenommen. Die Überexpression von wildtypischen Rac1 im *schizo*^{C1-28} mutanten Hintergrund mit Hilfe der *twi*-Gal Treiberlinie war jedoch nicht in der Lage, die Bildung von mehrkernigen Muskeln einzuleiten (Abb. 20G). Ähnlich wie in homozygot *schizo*^{C1-28} mutanten Embryonen (Abb. 20F) waren unzählige unfusionierte Myoblasten zu erkennen, die sich an elongierte FCs anlagern (Abb. 20G).

Auf der Basis von anti-Rac-Antikörperfärbungen wurde postuliert, dass Rac in Abhängigkeit von Schizo in FC an die Plasmamembran rekrutiert wird (Chen et al., 2003). Es wird generell angenommen, dass inaktives GDP-gebundenes Rac zytosolisch vorliegt und erst nach Aktivierung mit der Plasmamembran assoziiert (Takai et al., 1995). Daher wurden weiterhin Rettungsexperimente mit einer konstitutiv-aktiven Form von Rac1 (Rac1^{G12V}, Lou et al., 1994) durchgeführt. Um eine Expression im *schizo*^{C1-28} mutanten Hintergrund zu gewährleisten, wurde zunächst die UAS-*rac1*^{G12V} Insertion auf das *schizo*^{C1-28} Allel rekombiniert (Kap. 5.2.6.). Die mesodermale Überexpression des konstitutiv-aktiven Rac1 im *schizo*^{C1-28} mutanten Hintergrund konnte jedoch nicht die Bildung von mehrkernigen Muskel einleiten (Abb. 20H). An dieser Stelle ist allerdings festzuhalten, dass diese Embryonen nicht den charakteristischen *schizo*^{C1-28} Phänotyp (Vergl. Abb. 20F mit H) aufweisen, sondern deutlich in der Morphologie verändert sind, eine verzögerte Entwicklung, Defekte in der Kopfreion und in dem Dorsalschluss aufweisen. Während sich das Muster an unfusionierten FCMs und sich elongierten FCs in *schizo*^{C1-28} mutanten Embryonen in jedem Segment sehr stark ähnelt, unterscheidet sich in Embryonen mit mesodermal exprimierten Rac1^{G12V} die Verteilung der FCs und FCMs zwischen den einzelnen Segmenten und erscheint unregelmäßig. Zudem sind große Lücken in der Muskulatur zu erkennen und es scheint, als ob ganze Muskelgruppen fehlen. Daher wurde auch die Überexpression von konstitutiv-aktiven Rac im wildtypischen Hintergrund analysiert. Auch die mesodermale Überexpression des konstitutiv-aktiven Rac1 im wildtypischen Hintergrund hatte drastische Auswirkungen auf die Körperwandmuskulatur. Embryonen zeichnen sich durch eine unregelmäßige Anordnung von Myoblasten oder Minimuskeln aus und zeigen starke morphologische Veränderungen (Abb. 21A). Sollte Schizo in der Aktivierung der Rac-GTPase fungieren, sollte die Herausnahme einer Kopie von *schizo* den Rac1^{G12V} induzierten Phänotyp abschwächen. Dies war jedoch nicht der Fall (Abb. 21B).

Diese Daten lassen vermuten, dass die frühe mesodermale Expression von Rac1^{G12V} bereits zu Defekten in der Spezifikation der mesodermalen Geweben führt, was sekundär in Fusionsdefekten resultiert. Aus diesem Grund wurden die Überexpressionsanalysen und Rettungsexperimente mit der *sns4,5*-Gal Treiberlinie wiederholt, die die Expression von Gal4 in FCMs ab dem Stadium 11 aktiviert (Stute et al., 2006) und somit die Expression des Rac1^{G12V} erst nach der Determination von FCs und

FCMs erfolgt. Die FCM-spezifische Expression des konstitutiv-aktiven Rac1 mit Hilfe von *sns4,5*-Gal4 führt zu keinen Defekten in der Muskulatur (Abb. 21D). Sollte Schizo in der Lokalisation und Aktivierung der Rac1 GTPase involviert sein, dann sollte die Überexpression von UAS-*rac1*^{G12V} in FCMs im *schizo*^{C1-28} mutanten Hintergrund zumindest eine partielle Wiederherstellung der Muskulatur bewirken. Diese Embryonen zeigten jedoch den typischen *schizo*^{C1-28} mutanten Fusionsdefekt mit vielen unfusionierten Myoblasten, die sich an die FCs anlagern (Abb. 21F). Es konnte also keine Verbesserung des Fusionsdefektes durch konstitutiv-aktives Rac1 erzielt werden. Des Weiteren wurde auch die FCM spezifische Expression von konstitutiven Rac1 untersucht, in denen *schizo* in heterozygoter Situation vorliegt. Diese Embryonen zeigen ein wildtypisches Muskelmuster (Abb. 21E).

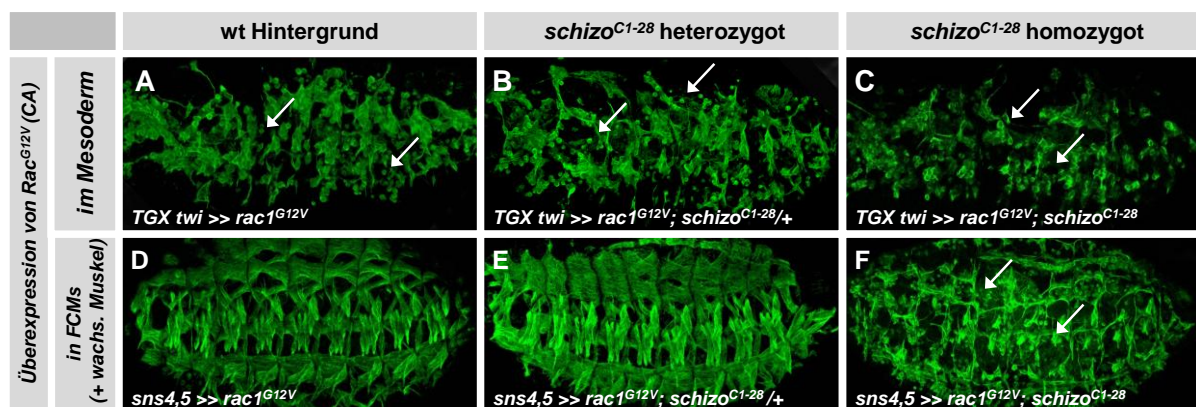


Abb. 21 Frühe mesodermale, jedoch nicht die FCM-spezifische Expression von konstitutiv-aktiven Rac1^{G12V} führt zu Störungen während der Muskelentwicklung und ist unabhängig von *schizo*

β3-Tubulin-Antikörperfärbung an Stadium 16 Embryonen. Anterior ist links, dorsal ist oben.

Überexpression von konstitutiv-aktivem Rac1 (UAS-*rac1*^{G12V}) im frühen Mesoderm mit Hilfe von *twi*-Gal4 im sonst wildtypischen Hintergrund (A), im heterozygot (B) und homozygot (C) *schizo*^{C1-28} mutanten Hintergrund führt zu deutlichen Störungen der Muskulatur. Unfusionierte Myoblasten (Pfeil) und in der Morphologie veränderte, gestauchte „Minimuskeln“ treten auf. Die Embryonen haben eine verzögerte Entwicklung, weisen Dorsalschlussprobleme auf und sind deformiert. Die FCM-spezifische Überexpression (*sns4,5*-Gal4 Treiberlinie) von konstitutiv-aktiven Rac1 (UAS-*rac1*^{G12V}) im wildtypischen Hintergrund (D) oder im heterozygot *schizo*^{C1-28} mutanten Hintergrund (E) resultiert in keinem Fusionsdefekt. Embryonen, in denen konstitutiv-aktives Rac1 in FCMs im *schizo*^{C1-28} mutanten Hintergrund überexprimiert wurde, zeigen den charakteristischen *schizo*^{C1-28} mutanten Phänotyp.

Insgesamt betrachtet zeigen diese Experimente, dass weder die Einführung von wildtypischem Rac im Mesoderm, noch die FCM-spezifische Expression von konstitutiv-aktiven Rac1 in FCMs im *schizo*^{C1-28} mutanten Hintergrund die Bildung von mehrkernigen Muskeln fördert. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Schizo entweder nicht in der Aktivierung und Lokalisation der Rac1-GTPase involviert ist oder dass es zumindest nicht der einzige Signalweg sein kann.

Weiterhin kann postuliert werden, dass die frühe mesodermale Expression von konstitutiv-aktiven Rac1 bereits zu Störungen in der Mesodermdifferentenzierung führt und sekundär Fusionsdefekte auftreten. Diese Vermutung zudem wird durch eine kürzlich veröffentlichte Studie unterstützt, in der gezeigt werden konnte, dass im *twi*-Muster exprimiertes konstitutiv-aktives Rac1 die Einwanderung des Mesoderms stört (Van Impel et al., 2009). Auf der anderen Seite scheint die Expression von konstitutiv-aktivem Rac auch „echte“ Fusionsdefekte hervorzurufen, da die mesodermale Expression

nach erfolgter Spezifikation der Myoblasten mit Hilfe der *mef2*-Treiberlinie in Fusionsdefekten resultiert, jedoch keine Störungen in dem Dorsalschluss oder der Morphologie auftreten (Daten nicht gezeigt). Daher kann geschlossen werden, dass konstitutiv-aktives Rac einerseits mit der Migration der mesodermalen Zellen interferiert, andererseits aber auch Fusionsdefekte auslöst.

3.4.3. Es findet kein Zusammenspiel zwischen Arf-GTPasen und Rac1 statt

Arf6 kontrolliert die Umorganisation des Zytoskeletts durch ein koordinatisches Zusammenspiel mit der Rac-GTPase. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Expression von dominant-negativen Arf6T27N in der Lage ist, die durch konstitutiv-aktives Rac Varianten induzierten Membran-Vorsätze in Zellen zu inhibieren (Radhakrishna et al., 1999). Um zu analysieren, ob Rac1 und D-Arf1 bzw. D-Arf6 kooperieren, wurde die Dosis des verfügbaren Arfs in Embryonen herabgesetzt, welche konstitutiv-aktives Rac1 im Mesoderm exprimieren. Die Herausnahme einer Kopie von *d-arf6* oder *d-arf1* führte jedoch nicht zu einer Abschwächung des Rac1^{G12V} induzierten Phänotyps (Abb. 22B, C). Die Überexpression von GTP-gebundenen, aktiven D-Arf1 resultiert in vergleichbaren Störungen in der Muskulatur wie nach Expression von konstitutiv-Aktivem Rac. Es besteht daher die Möglichkeit, dass ein konstitutiv-aktives D-Arf1 auch zu einer konstitutiven Rac Aktivierung führt. In diesem Falle sollte die Herabsetzung der Gendosis von *rac1* eine Abschwächung des Fusionsdefektes bewirken. Dies war jedoch nicht der Fall (Abb. 22D und E).

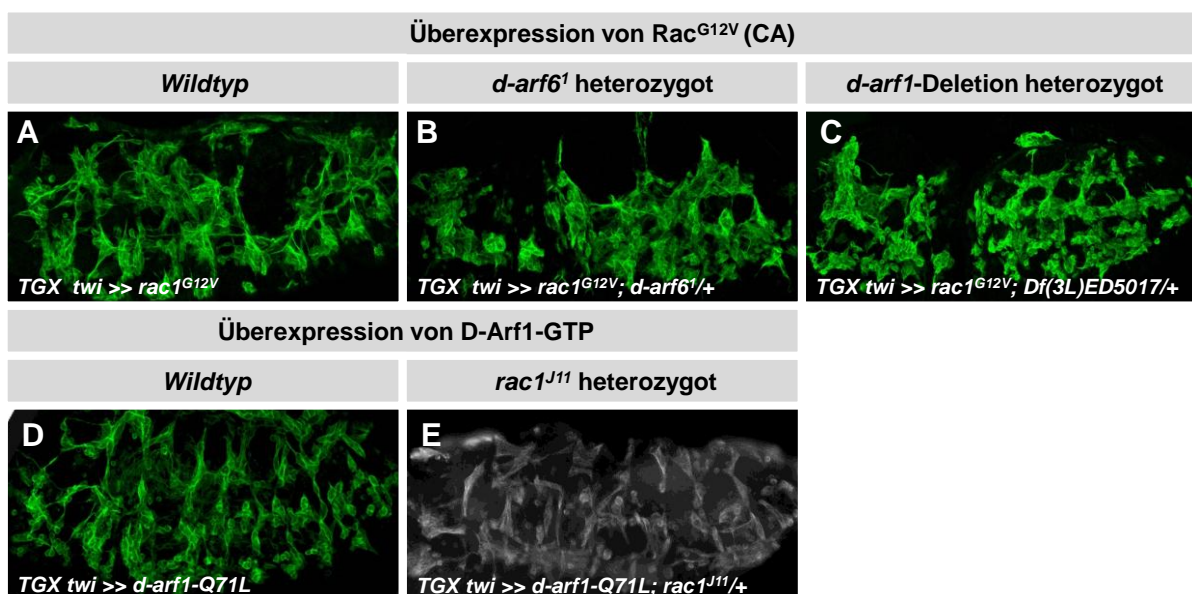


Abb. 22 D-Arf und Rac-GTPase Signalwege sind nicht koordiniert

ß3-Tubulin Färbungen an Stadium 16 Embryonen. Anterior ist links, dorsal ist oben.

Die mesodermale Überexpression von konstitutiv-aktiven Rac1 (UAS-*rac1*^{G12V}) mit Hilfe von *twi*-Gal4 führt zu starken Defekten im somatischen Mesoderm. (A). Die Herausnahme einer Kopie von *d-arf6* (B) oder *d-arf1* (*DF(3L)ED5017*) (C) hat keinen Einfluss auf die Ausprägung des Überexpressionsphänotyps. Die mesodermale Expression des GTP-gebundenen, aktiven D-Arf1 (UAS-*d-arf1-Q71L*) unter dem *twi*-Promotor leitet Fusionsdefekte ein (D). Die Reduktion der *rac1* Gendosis auf das halbe Level bewirkt keine Abschwächung oder Verstärkung des Phänotyps (E).

3.4.4. *scar; rac1* Doppelmutanten zeigen einen deutlichen Fusionsdefekt

Rac-GTPasen sind wichtige Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts, in dem sie unter anderem die Wave vermittelte F-Aktin Polymerisierung regulieren (Miki & Takenawa, 2003). Vertebraten Wave Proteine liegen gewöhnlicherweise in einem Komplex mit Sra1/Pir121, Nap1, Abi und Hsp300 und werden darüber in einem inaktivem Zustand gehalten (Review: Takenawa & Suetsugu, 2007). Aktivierung erfolgt gewöhnlicher Weise durch GTP-gebundenes Rac, obwohl unterschiedliche Studien über den Mechanismus der Aktivierung existieren. Eine Studie konnte zeigen, dass GTP-gebundenes Rac die Dissoziation des Wave Komplexes einleitet und über die Freisetzung die Aktivierung von Wave reguliert (Eden et al., 2002). Andererseits wurde berichtet, dass GTP-gebundenes Rac in der Lokalisation des Wave-Komplexes wirkt (Innocenti et al., 2004) ohne eine Dissoziation des Komplexes zu veranlassen. Weitere Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung des Wave-Komplexes zusätzliche Faktoren benötigt, wie z.B. interagierende Proteine wie IRSp53 (Suetsugu et al., 2006) oder spezielle Phospholipide (Lebensohn & Kirschner, 2009). Ein ähnlicher regulatorischer Komplex liegt wahrscheinlich auch in *Drosophila* vor (Ismail et al., 2009). Auch das *Drosophila* Homolog von Wave, Scar, wird während der Myoblastenfusion benötigt (Richardson et al., 2007; Berger et al., 2008). Die Tatsache, dass *rac1*, *rac2*, *mtl* Tripel Mutanten (Hakeda-Suzuki et al., 2002; Richardson et al., 2007) einen zu *scar* maternal und zygotischen Verlustmutanten (Richardson et al., 2007) vergleichbaren Phänotyp zeigen, deutet bereits darauf hin, dass Rac auch während der Myoblastenfusion eine Rolle in der Regulation der Scar-vermittelten Aktin-Polymerisation ausübt. Jedoch fehlen bislang *in vivo* Daten, welche eine Verbindung zwischen Rac und Scar demonstrieren (siehe auch Diskussion in Rochlin et al., 2009, Haralalka & Abmayr, 2010). Um einen Zusammenhang zwischen Rac1 und Scar aufzudecken, wurden *scar*^{k13811}; *rac1*^{J11} Doppelmutanten hergestellt (Kap. 5.2.5). *rac1*^{J11} oder *scar*^{k13811} Einzelmутanten Mutanten zeigen keinen (Abb. 23B) oder nur einen leichten Fusionsdefekt (Abb. 23C), da aufgrund von funktioneller Redundanz zur Rac2 GTPase, bzw. der Anwesenheit von maternal bereitgestellter *scar* mRNA keine vollständige Funktionsverlust-Situation vorliegt (Hakeda-Suzuki et al., 2001; Richardson et al., 2007). Die gleichzeitige Herabsetzung von verfügbarem *rac1* und *scar* sollte daher in einer Verstärkung des Fusionsphänotyps resultieren. In der Tat konnte dies in *scar*^{k13811}; *rac1*^{J11} Doppelmutanten beobachtet werden (Abb. 23D-F). Es treten unzählige unfusionierte Myoblasten, nur sehr dünne Muskeln und größere Löcher bzw. Lücken in der Muskulatur auf. Des Weiteren ist zu bemerken, dass einige Embryonen starke Entwicklungsdefekte aufweisen und unterschiedlich stark ausgeprägte Deformationen zeigen. Diese Embryonen sind nicht in der Lage, den dorsalen Schluss zu vollziehen, sich entlang der anterior-posterioren Achse zu strecken und zeigen bei starker Ausprägung sogar Defekte in der Segmentierung (Abb. 23F). Dieses Experiment unterstützt die bisherige Vermutung, dass Rac1 in dem Scar vermittelten Signalweg involviert ist.

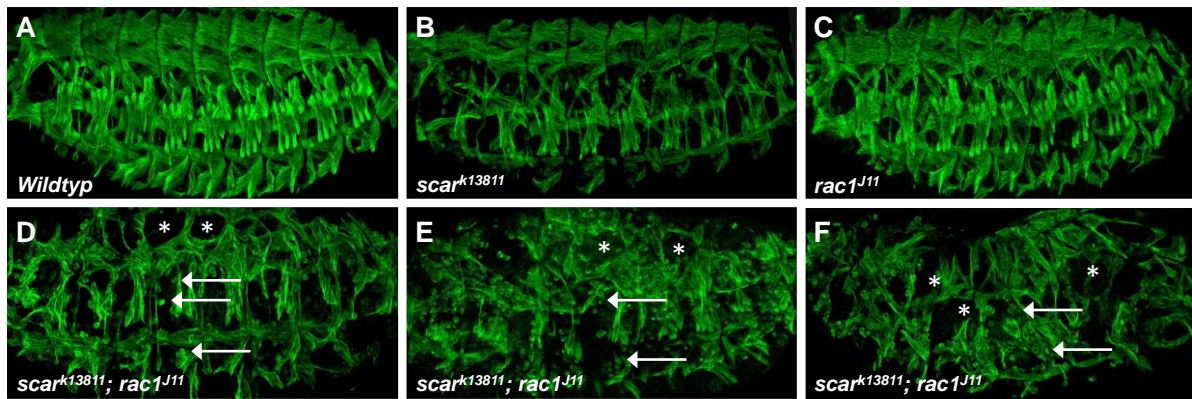


Abb. 23 *scar*; *rac1* Doppelmutanten zeigen einen drastischen Fusionsdefekt

β3-Tubulin Färbungen an St. 16 Embryonen. Lateralansicht, anterior ist links, dorsal ist oben.

Wildtypische (A) und homozygote *rac1*^{J11} mutante Embryonen (B) zeigen keinen Fusionsdefekt, während homozygote *scar*^{k13811} mutante Embryonen unfusionierte Myoblasten und kleine Lücken (Stern) in der Muskulatur zeigen (C). *scar*^{k13811}; *rac1*^{J11} Doppelmutanten zeigen einen verstärkten Fusionsdefekt mit zahlreichen unfusionierten Myoblasten (Pfeile) und großen Lücken (*) in der Muskulatur (D-F). Zudem scheinen die Embryonen generell in der Entwicklung gestört, wobei der Grad der Deformation zwischen den einzelnen Embryonen variiert (Vgl. D, E und F).

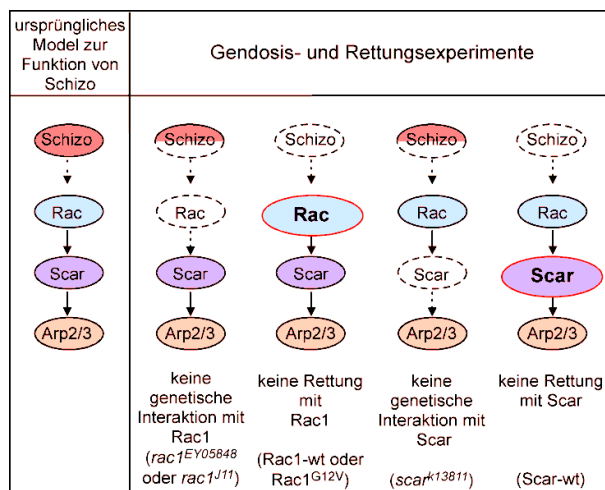
3.4.5. Der *schizo*^{C1-28} Fusionsphänotyp lässt sich durch die Expression von Scar nicht retten und *schizo* und *scar* interagieren nicht genetisch

Aufgrund der Behauptung von Chen et al. (2003), dass Schizo in der Lokalisation der Rac-GTPase fungiert, wurde generell angenommen, dass der Schizo-Signalweg in der Scar-vermittelten Aktinorganisation integriert ist. Parallel zu den Gendosis- und den Rettungsexperimenten mit Rac, wurde daher der Zusammenhang von Schizo und Scar untersucht.

Um zu analysieren, ob Scar eine stromabwärtsliegende Komponente von Schizo ist, wurden Rettungsexperimente mit wildtypischen Scar Protein vorgenommen. Mesodermal (*twi*-Gal4) überexprimiertes Scar war jedoch nicht in der Lage, den Fusionsdefekt von *schizo*^{C1-28} mutanten Embryonen aufzuheben (Daten nicht gezeigt). Neben dem Rettungsexperiment wurden zudem Gendosisexperimente durchgeführt, um aufzuklären, ob *scar* im Signalweg von *schizo* liegt. Dafür wurde das hypomorphe *scar*^{k13811} Allel benutzt, welches durch eine im 5'UTR Bereich des *scar* Transkriptes inserierte P-Element Insertion verursacht wird (Zallen et al., 2002; Schenk et al., 2004) und *scar*^{k13811}; *schizo*^{C1-28} Doppelmutanten etabliert (Kap. 5.2.5). Homozygote *scar*^{k13811} Mutanten zeichnen sich durch einen leichten Fusionsdefekt aus. Die Reduktion der Gendosis von *schizo* auf das halbe Level konnte keine deutliche Verstärkung des Fusionsphänotyps hervorrufen (Daten nicht gezeigt). Somit zeigen *schizo* und *scar* während der Myoblastenfusion keine genetische Interaktion. Diese Resultate unterstützen die Vermutung, dass die Funktion von Schizo nicht für die Rac -> Scar vermittelte Aktinregulation benötigt wird.

3.4.6. Übersicht über die Gendosis- und Rettungsexperimente zur Aufklärung der möglichen Funktion von Schizo im Rac1->Scar Signalweg

Dieser Abschnitt der Arbeit widmetete sich der Fragestellung, ob Schizo in der Rac-> Scar vermittelten Aktin-Polymerisation involviert ist (Abb. 24). Dosis-sensitive genetische Interaktionstests konnten kein Zusammenspiel von *schizo* und *rac1* aufdecken. Dazu konnte weder die mesodermale Überexpression von wildtypischen Rac1 noch die FCM-spezifische Überexpression von konstitutiv-aktiven Rac1 im homozygot *schizo* mutanten Hintergrund eine Rettung bzw. eine partielle Rettung des Fusionsdefekt erreichen. Gleichermäßen konnte keine genetische Interaktion zwischen *schizo* und *scar*, sowie keine Rettung des *schizo* induzierten Fusionsdefekt durch einen Überschuss an Scar im Mesoderm beobachtet werden. Aus diesen Experimenten kann geschlussfolgert werden, dass der Schizo-Signalweg nicht über Rac1 und Scar funktioniert. Zudem konnte beobachtet werden, dass die frühe mesodermale Expression starke Störungen in der Entwicklung der Embryonen hervorruft. Der durch konstitutiv-aktives Rac1 induzierte Myogenese Defekt ließ sich weder durch die Herausnahme einer Kopie von *schizo*, noch durch die Herausnahme einer Kopie der von *d-arf6* oder *d-arf1* abschwächen. Umgekehrt konnte der durch die Überexpression von GTP-gebundenem D-Arf1 abgeleitete Fusionsdefekt nicht durch eine Reduktion der *rac1* Dosis abgeschwächt werden. Aus diesen Experimenten kann weiterhin geschlussfolgert werden, dass es keine Kopplung zwischen den Arf- und Rac-GTPase Signalwegen während der Myoblastenfusion gibt.



Interaktion beobachtet werden.

Abb. 24 Übersicht über Gendosis- und Rettungsexperimente

Spalte 1: Postulierter Signalweg von Schizo in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts. Spalte 2 gibt schematisch die durchgeführten Gendosis- und Rettungsexperimente wider. Leere Kreise geben eine homozygote Situation, halb ausgefüllte Kreise eine heterozygote Situation des jeweiligen Allels wieder. Die in den Rettungsexperimenten überexprimierten Proteine sind durch einen größeren Kreis mit roter Umrandung hervorgehoben. Bei *schizo* handelt es sich um das Allel *schizo^{CI-28}*, die weiteren benutzten Allele und UAS-Konstrukte sind in Klammern angegeben. In keinem Fall konnte ein Rettung des *schizo^{CI-28}* mutanten Phänotyps oder eine genetische

3.4.7. *schizo* zeigt keine genetische Interaktion mit *wasp*

Neben Scar gibt es einen weiteren Aktin Regulator, Wasp, der während der Myoblastenfusion in der Aktivierung des Arp2/3 Komplexes involviert ist (Schäfer et al., 2007; Berger et al., 2008). Um endgültig auszuschließen, dass der Schizo vermittelte Signalweg in der Arp2/3 basierten Aktin-Polymerisierung resultiert, wurde eine genetische Interaktion zwischen *wasp* und *schizo* untersucht. Dazu wurden *schizo^{CI-28}*, *wasp^{3D3-035}* rekombinante Fliegen hergestellt (Kap. 5.2.6). Homozygote *wasp^{3D3-035}* mutante Embryonen zeigen einen deutlichen Fusionsdefekt mit unfusionierten Myoblasten

und Lücken in der Muskulatur (Schäfer et al., 2007). In transheterozygoter Situation zu dem *wasp*³-Allel ist der Fusionsdefekt weniger stark ausgeprägt. Die Herausnahme einer Kopie von *schizo* hat keine Auswirkungen auf den *wasp*^{3D3-035} oder dem *wasp*^{3D3-035}/*wasp*³ Fusionsphänotyp (Daten nicht gezeigt). Somit findet also keine genetische Interaktion zwischen *schizo* und dem Aktinregulator *wasp* statt.

Zusammenfassend kann daraus geschlussfolgert werden, dass Schizo nicht in der Regulation der Arp2/3 basierten Aktin-Polymerisation involviert ist.

3.5. Identifizierung des mesodermal exprimierten Arf-GTPase aktivierende Proteins D-Git und seine Funktion in der Muskelanheftung und Wegfindung

Arf-GTPasen zyklisieren zwischen einer GDP-gebundenen, inaktiven und GTP-gebundenen Form, in der sie spezifisch mit Effektorproteinen interagieren. Aktivierung und Inaktivierung der Arf-GTPasen wird dabei durch Arf-Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (Arf-GEFs) bzw. Arf-GTPase aktivierende Proteine (Arf-GAPs) vermittelt. Die Tatsache, dass die mesodermale Überexpression von GTP-gebundenen, aktiven D-Arf1 Defekte in der Muskulatur hervorruft, impliziert, dass auch die Inaktivierung der Arf-GTPasen eine Rolle in der Myoblastenfusion spielt. Aus diesem Grund sollte das Expressionsmuster der Arf-GAP kodierenden Gene und mögliche Kandidaten hinsichtlich einer Funktion in der Muskelentwicklung untersucht werden.

3.5.1. Arf-GTPase aktivierende Proteine in *Drosophila*

Mitglieder der Arf-GAP Familie sind durch die Anwesenheit der enzymatischen Arf-GAP Domäne charakterisiert, die die Hydrolyse des an das Arf-GTPase gebundene GTP katalysieren. In Säugetieren gibt es insgesamt 31 Arf-GAP kodierende Gene, die anhand von weiteren funktionellen Domänen und phylogenetischen Analysen in 10 Untergruppen unterteilt werden können (Gillingham und Munro, 2007; Campa und Randazzo, 2008). Interessanterweise gibt es in *Drosophila* 9 Arf-GAP kodierende Gene, die jeweils ein Mitglied der aus Säugern bekannten Unterfamilie repräsentieren (siehe Tabelle 6 und Abb. 25A; Gillingham und Munro, 2007; Bernards, 2003). Lediglich die aus Säugetieren bekannte Centaurin- α -Unterfamilie hat keinen Vertreter in *Drosophila*.

Um erste Hinweise zu erlangen, welcher Arf-GAP möglicherweise eine Rolle in der Myoblastenfusion von *Drosophila* spielt, wurde mittels *in situ*-Hybridisierungen das mRNA Verteilungsmuster der Arf-GAP kodierenden Gene untersucht. Die meisten der untersuchten Arf-GAPs zeigen eine dynamische mRNA-Verteilung während der embryonalen Entwicklung (Abb. 25). Interessanterweise zeigen *CG16728* und *rhoGAP15B* eine spezifische Expression im somatischen und viszerale Mesoderm während fusionsrelevanten Stadien (Abb. 25D, H). *CG16728* kodiert für das *Drosophila* Homolog der aus Säugern bekannten Arf-Gaps der Git1/2 Unterfamilie und wird daher im Folgenden als *Drosophila git* oder kurz *d-git* bezeichnet. RhoGap15B repräsentiert ein entferntes Homolog aus der Centaurin δ - oder ARAP Unterfamilie der ARF-GAPs.

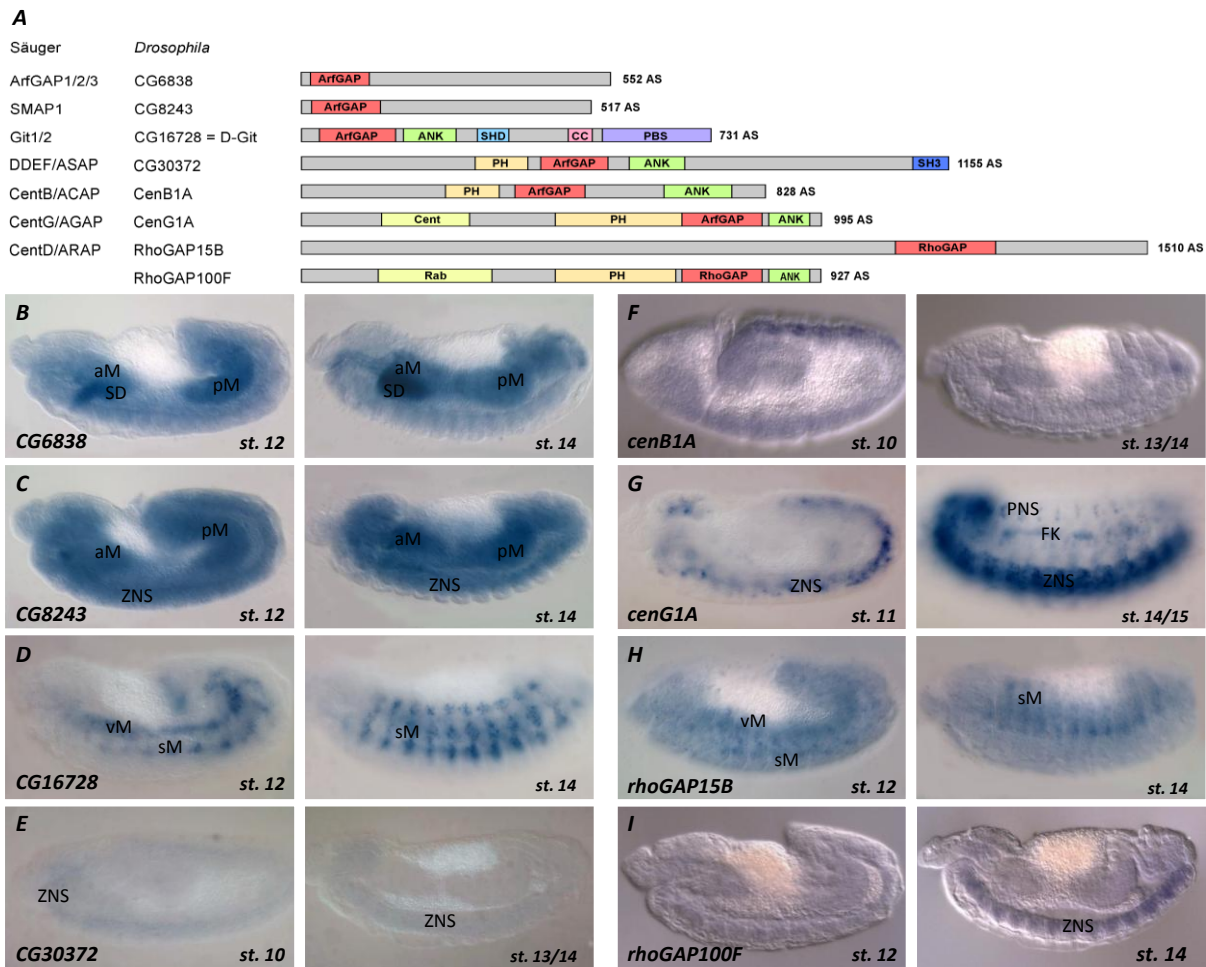


Abb. 25 Domänenstruktur und mRNA-Verteilung der untersuchten *Drosophila* Arf-GAPs

(A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Arf-GAPs nach Expasy Prosite. CG6838 und CG8243 als Homologe der ArfGAP1 und SMAP1 Familie besitzen ausschließlich eine N-terminale Arf-GAP-Domäne. CG16728 beinhaltet zusätzlich zu der Arf-GAP-Domäne die für Git Proteine charakteristische Spa-Homologie Domäne (SHD), sowie Ankyrin-Wiederholungen (ANK) und ein Paxillin-Bindestelle (PBS) und repräsentiert damit ein Arf-GAP der Git-Familie. Die Bezeichnung AZAP fasst die Arf-GAPs mit Ankyrin Wiederholungen (ANK) und Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen zusammen. Unter diesen enthält CG30372 eine weitere Src3-Homologie (SH3)-Domäne und gehört daher zur Unterfamilie der DDEF oder ASAP ArfGAPs. CentB1A ist das *Drosophila* Homolog der Centaurin- β oder ACAP-Unterfamilie. Aufgrund der Centaurin- γ -spezifischen Domäne repräsentiert *Drosophila* CenG1A die Centaurin- γ oder AGAP-Unterfamilie. Mitglieder der ARAP oder Centaurin- δ Unterfamilie sind durch die zusätzliche RhoGAP-Domäne charakterisiert. RhoGAP15B und RhoGAP 100F sind die verwandten Proteine in *Drosophila*, auch wenn sie keine Arf-GAP Domäne aufweisen.

(B-I) *in situ*-Hybridisierungen an whole-mount Embryonen mit spezifischen mRNA Sonden gegen CG6838 (B), CG8243 (C), CG16728 (D), CG30372 (E), cenB1A (F), cenG1A (G), rhoGAP15B (H) und rhoGAP100F (I). Gezeigt sind repräsentative Embryonen der fusionsrelevanten Stadien 11/12 (links) und Stadium 13/14 (rechts). Anterior ist links, dorsal ist oben. CG6838 zeigte eine mRNA Verteilung im anterioren und posterioren Teil des einwandernden Endoderm und in den Speicheldrüsen (B). Das Transkript des CG8243 wurde ubiquitär während der ganzen Entwicklung detektiert (C). CG16728 zeigt eine spezifische Expression im somatischen und viszeralen Mesoderm (D). Die CG30372 spezifische mRNA konnte nur sehr schwach in dem ZNS nachgewiesen werden (E). cen1BA zeigte eine mRNA Verteilung in einer Reihe dorsaler Zellen (F). Für cenG1A konnte ein dynamisches Expressionsmuster in dem ZNS, dem PNS und dem Fettkörper festgestellt werden (G). Das Transkript von rhoGap15B wurde spezifisch im somatischen und viszeralen Mesoderm detektiert (H). rhoGAP100F zeigte eine mRNA Verteilung im ZNS (I). Abkürzungen: aM anteriorer Mitteldarm, FK Fettkörper, pM posterior Mitteldarm, PNS Peripheres Nervensystem, SD Speicheldrüsen, sM somatisches Mesoderm, vM viszerale Mesoderm, ZNS Zentrales Nervensystem

Tabelle 6 Übersicht über Arf-GAP Proteine in *Drosophila*

Säugetier	<i>Drosophila</i>	Chromosomale Lokalisation	mRNA Expression	Phänotyp in der Muskulatur (Analyse von genomischen Defizienzen)
Arf-GAPs	Arf-Gap			
ArfGAP1	<i>Gap69C</i> (CG4237)	69B5	-Nicht untersucht, da cDNA falsch -ubiquitär im Embryo (Frolov und Alatortsev, 2001)	- Nicht untersucht - Deletionsmutanten für Gap69C sind vital und fertil (Frolov und Alatortsev, 2001)
ArfGAP1/2/3	<i>CG6838</i>	79F6	maternal, einwanderndes Endoderm, Epidemid	Keine Defekte
SMAP1	<i>CG8243</i>	44F7-8	maternal, ubiquitär	Keine Defekte
HRB	<i>drongo</i> (CG3365)	21E2	Segmentierungsen-artig (FlyExpress)	Nicht untersucht
Git1/2	<i>d-git</i> (CG16728)	47B1	maternal, somatisches und viszerale Mesoderm	Wegfindungsdefekte, selten Anheftungsdefekte
DDEF/ASAP s/AMAPs	<i>CG30372</i>	44B2	Nicht maternal, Schwach im ZNS	Keine Defekte
CentB/ACAP	<i>cenB1A</i> (CG6742)	94E1	maternal, streifenweise im Blastoderm, ZNS, Hinterdarm,	Keine Defekte
CentG/AGA P	<i>cenG1A</i> (CG31811)	34D6-E2	maternal, ZNS, PNS, Fettkörper	Keine Defekte
CentD/ARAP	<i>rhoGAP15B</i> (CG4937)	15C4	Maternal ? Somatisches und viszerale Mesoderm	Fusionsdefekts unklar
	<i>rhoGAP100F</i> (CG1976)	100D2	Nicht maternal, ZNS	Nicht untersucht

3.5.2. Analyse von genomischen Defizienzen für *d-git*

Die spezifische Transkription von *d-git* im somatischen Mesoderm lässt eine Rolle von D-Git während der Muskelentwicklung in *Drosophila* vermuten. Zu Beginn dieser Arbeit standen für *d-git* jedoch keine Mutanten zur Verfügung, so dass zunächst verschiedene genomische Defizienzen analysiert wurden, in denen *d-git* neben anderen Genen deletiert ist. Die kleinsten verfügbaren Defizienzen *Df(2R)ED2076* und *Df(2R)ED2098* umfassen die genomischen Bereiche 47A10-47C1 bzw. 47A7-47C6. Die phänotypische Analyse der Muskulatur dieser Defizienzen hat ergeben, dass zwar Muskeln gebildet werden, jedoch auch unfusionierte Myoblasten und fehlgeleitete Muskeln vorhanden sind (Daten nicht gezeigt). Insgesamt betrachtet schienen diese Embryonen aber auch generelle Entwicklungsstörungen zu haben. Da in diesen Defizienzen 36, bzw. 55 weitere Gene deletiert sind, ist es somit nicht möglich die genaue Funktion von D-Git aufzuklären. Aus diesem Grund war die Generierung einer spezifischen Mutante für *d-git* notwendig.

3.5.3. Isolierung und molekulare Charakterisierung der Deletionsmutante *d-git*^{Δa}

Eine Möglichkeit zur Herstellung von Deletionsmutanten ist die P-Element-Exzisionsmutagenese, bei der das unpräzise Herausspringen eines P-Elementes zur Deletion umliegender genomischer Bereiche führen kann (Kap. 5.2.7). Für die Herstellung einer Deletionsmutante für *d-git* wurde das 528 bp vor dem Translationsstart integrierte, vitale P-element *P{EPgy2}CG16728*^{EY07259} verwendet. In Zusammenarbeit mit Elisabeth Klaus konnten durch die Mobilisierung dieses P-Elementes 4 unabhängige Linien isoliert werden, die Letalität in Transheterozygose zu den Defizienzen *Df(2R)ED2076* und *Df(2R)ED2098* aufweisen und damit putative Allele für *d-git* darstellen (siehe Staatsexamensarbeit E. Klaus, 2007). Unter diesen Linien befand sich das Allel *d-git*^{Δa} (auch als JOCLa bezeichnet), welches im Folgenden weiter molekular und funktionell charakterisiert wurde.

PCRs mit spezifischen Primern an genomischer DNA von homozygoten *d-git*^{Δa} Embryonen haben ergeben, dass es sich bei der Mutante *d-git*^{Δa} um eine Deletion handelt, die ausgehend von der ursprünglichen Lokalisation des P-Elementes mindestens 1800 bp und maximal 2300 bp in Richtung der kodierenden Region von *d-git* umfasst (Abb. 26). Dabei wurde die 5'UTR, das erste Exon inklusive des Startkodons, sowie das zweite Exon von *d-git* deletiert. Eine Deletion des dritten Exons ist zudem möglich. Der Verlust des Startkodons indiziert bereits, dass es sich bei der erzeugten Mutante um ein Funktionsverlustmutante handelt. *In situ*-Hybrisierungen konnten zudem bestätigen, dass das *d-git* Transkript in homozygoten *d-git*^{Δa} Mutanten nicht mehr vorhanden ist (Abb. 27B) und es sich somit bei *d-git*^{Δa} um ein Null-Allel handelt. Benachbarte Gene wurden durch die Exzisionsmutagenese nicht beeinflusst (Staatsexamensarbeit E. Klaus, 2007).

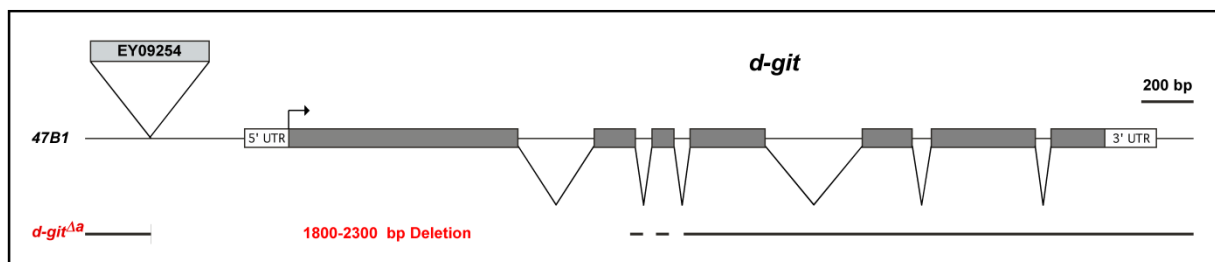


Abb. 26 Genomische Region von *d-git* und Exzisionsmutante *d-git*^{Δa}

Die genomische Region von *d-git* befindet sich auf dem 2. Chr. auf dem rechten Arm bei zytologischer Position 47B1. Weiße Kästchen geben die 5' und 3' UTR, graue Kästchen die kodierenden Regionen von *d-git* wieder. Das Dreieck kennzeichnet das für die Exzisionsmutagenese verwendete P-Element *P{EPgy2}CG16728*^{EY07259}, welches 528 bp von dem Translationsstart (Pfeil) integriert ist. Die Mobilisierung dieses P-Elementes resultierte in der Generierung des Allels *d-git*^{Δa}, in dem ausgehend von der ursprünglichen Integrationsort mindestens 1800 aber maximal 2300 bp deletiert sind. Das Startkodon von *d-git* ist dabei deletiert.

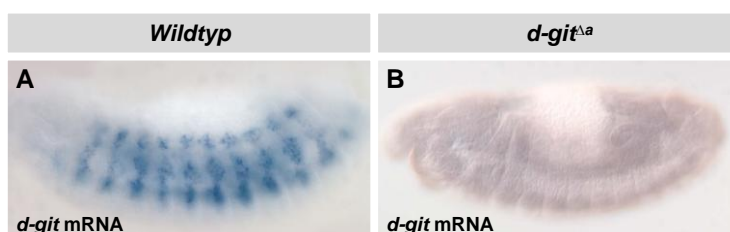


Abb. 27 In *d-git*^{Δa} Mutanten ist kein *d-git* Transkript nachweisbar

In situ-Hybridisierungen mit einer *d-git* spezifischen RNA-Sonde an Stadium 14 Embryonen. Anterior ist links, dorsal ist oben. Die für *d-git* charakteristische mRNA im somatischen Mesoderm (A, Wildtyp) ist in homozygoten *d-git*^{Δa} mutanten Embryonen (B) nicht vorhanden.

3.5.4. Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutante *d-git*^{Δa}

3.5.4.1. *d-git*^{Δa} Mutanten zeigen hauptsächlich Defekte in der Wegfindung der ventralen Muskeln

Drosophila git mRNA wird während der fusionsrelevanten Stadien spezifisch im somatischen und viszerale Mesoderm exprimiert, was auf eine Rolle in der Entwicklung dieser Muskulatur hindeuten kann. Die phänotypische Untersuchung der Muskulatur ließ jedoch keine offensichtlichen Störungen

in der Fusion zwischen FCs und FCMs erkennen, da mehrkernige Muskeln und nahezu keine unfusionierte Myoblasten zu beobachten waren (Abb. 28B und D). Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 28A) erschienen jedoch einige Muskelgruppen dünner (Stern, Abb. 28B), dieser Phänotyp konnte allerdings nicht in allen untersuchten Embryonen nachgewiesen werden. In ca. 10 % der Embryonen fand zudem eine Verdopplung der lateralen Muskeln statt (Pfeilkopf, Abb. 28B). In einigen Fällen schienen die lateralen Muskeln verkürzt, jedoch ist es nicht klar, ob es sich hierbei um einen echten Anheftungsdefekt handelt. In der Ansicht von der ventralen Seite war weiterhin zu beobachten, dass die Ventral Oblique (VO) Muskeln, welche sich ventral in Richtung des posterioren Endes austrecken, in *d-git*^{Δa} mutanten Embryonen zu weit auf die Mittellinie zuwachsen (Abb. 28D, Pfeil), während sie im Wildtyp niemals die Mittellinie erreichen und einen klar definierten Abstand zu Mittellinie lassen (Abb. 28C). Dies bedeutet, dass die Muskeln in *d-git*^{Δa} Mutanten sich zwar in Richtung ihrer epidermalen Anheftungsstelle wachsen, jedoch über ihr Ziel hinauswachsen. Dieser als „ByPass“-Phänotyp bekannte Phänotyp konnte niemals gleichermaßen in allen Segmenten beobachtet werden, hingegen waren lediglich in 30 % der Embryonen die VO-Muskeln von ein bis zwei Segmenten betroffen.

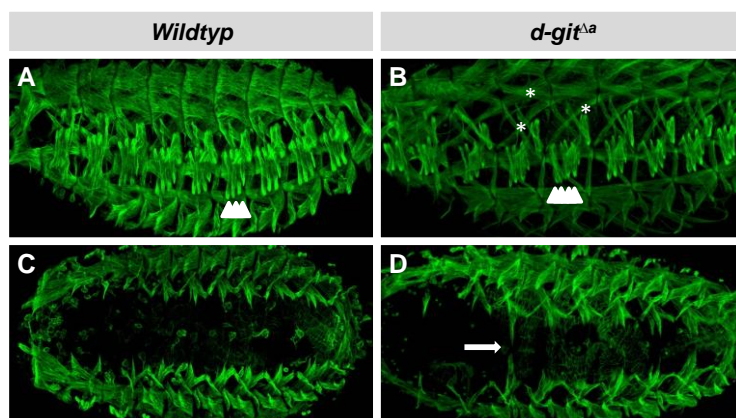


Abb. 28 *d-git*^{Δa} mutante Embryonen zeigen Defekte in der Wegfindung der Muskeln

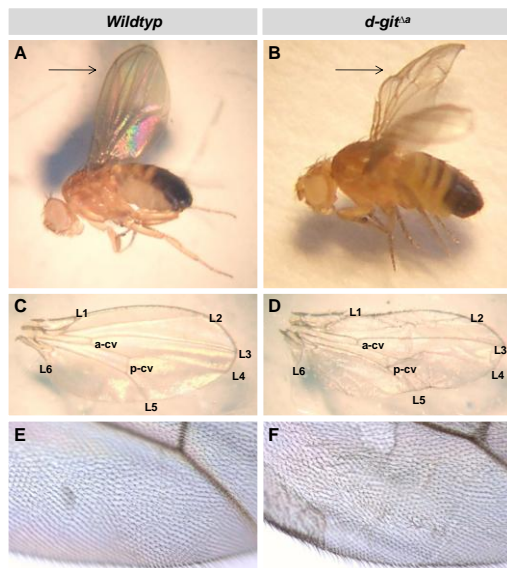
β3-Tubulin-Antikörperfärbung an Stadium 16 Embryonen. Anterior ist links. Lateralansicht (A, B) und Ansicht von ventral (C, D). In *d-git*^{Δa} mutanten Embryonen können im Vergleich zum Wildtyp (A) vereinzelt kleine Lücken in der Muskulatur (Stern) oder eine Verdopplung der lateralen Muskeln (Pfeilköpfe, 4 statt 3 im WT) beobachtet werden (B). In einigen Segmenten

wachsen die VO4/5 Muskeln zu weit auf die Mittellinie zu (Pfeil).

Aufgrund der hier präsentierten phänotypischen Analyse kann postuliert werden, dass der zygotische Verlust von *d-git* keinen Fusionsdefekt hervorruft. Dies kann einerseits bedeuten, dass D-Git nicht an der Regulation der Myoblastenfusion involviert ist oder andererseits, dass entweder maternal bereitgestelltes *d-git* für den Verlust von zygotischem *d-git* ersetzen kann oder D-Git in funktionieller Redundanz mit einem anderem Arf-GAP wirkt. Eine mögliche maternale Komponente von *d-git* als Ursache für das Fehlen eines Fusionsphänotyp konnte jedoch bereits in den Studien von Bahri et al. (2009) ausgeschlossen werden, die parallel zu dieser Arbeit eine vergleichbare Deletionsmutante für *d-git* hergestellt haben. Die Tatsache, dass *d-git*^{Δa} mutante Embryonen einen Defekt in der Wegfindung der Muskeln zeigen, kann auch daraufhindeuten, dass *d-git* mRNA bereits früh transkribiert wird und in den Myoblasten bereitgestellt wird, so dass D-Git-Protein direkt nach der Fusion für die Wegfindung der Muskeln zur Verfügung steht.

3.5.4.2. Adulte, homozygote *d-git*^{Δa} Mutanten zeigen zernknitterte Flügel

Da sich *d-git* auf dem zweiten Chromosom befindet, wurde das Allel *d-git*^{Δa} in Transheterozygose zu dem CyO Balancer-Chromosom etabliert. Bei Haltung des Stammes auf 25°C traten mit ca. 20 % der Nachkommen adulte homozygote, nicht CyO tragende auf. Diese Tiere zeigen mit 100% Penetranz einen sogenannten „crumpled wings“-Phänotyp, bei dem die Flügel eingefallen und zernknittert erscheinen (Abb. 29B, Pfeil). Diese adulten Tiere sind unfähig zu fliegen. In der näheren Betrachtung



ist zu erkennen, dass die Anzahl und Orientierung der Flügelvenen (L1-6, a-cv, p-cv) und der auf den Flügel befindlichen Haare nicht verändert ist (Abb. 29C-F). Neben dem beschriebenen Phänotyp zeigen homozygote adulte Tiere keine weiteren dominanten Phänotypen.

Abb. 29 Adulte *d-git*^{Δa} mutante Fliegen zeigen mit 100% Penetranz zernknitterte Flügel

Wildtypische Fliegen besitzen gerade ausgestreckte Flügel mit glatter Oberfläche (A). Im Gegensatz zeigen adulte homozygote *d-git*^{Δa} Fliegen zernknitterte Flügel, die nicht ganz ausgestreckt sind und eine unebene Gestalt aufweisen (B). Das charakteristische Muster der Flügelvenen (Longitudinal L1-L6 und Transversal a-cv und p-cv) (C, D), sowie die Anzahl und Orientierung der Flügel-Haare ist nicht beeinflusst (E, F)

3.5.4.3. Homozygote *d-git*^{Δa} Mutanten sind semi-letal

Eine detaillierte Bestimmung der Lebensfähigkeit (Kap. 5.2.10) der *d-git*^{Δa} Tiere während der einzelnen Entwicklungsstadien hat schließlich ergeben, dass im Gegensatz zu *w*¹¹¹⁸ Tiere (89 %) lediglich 59 % der homozygoten *d-git*^{Δa} Embryonen das erste Larvenstadium (L1) erreichen. Nahezu alle homozygoten Larven überleben dabei die larvalen Stadien L2 und L3 und erreichen schließlich das Puppen-Stadium (P), während nur 35 % der ursprünglichen homozygoten *d-git*^{Δa} Embryonen das Leben als adulte Fliege erreichen (Abb. 30). Somit kann die Mutante *d-git*^{Δa} als semi-letales Allel mit verringerter embryonaler Entwicklung und reduzierter Entpuppungsrate klassifiziert werden.

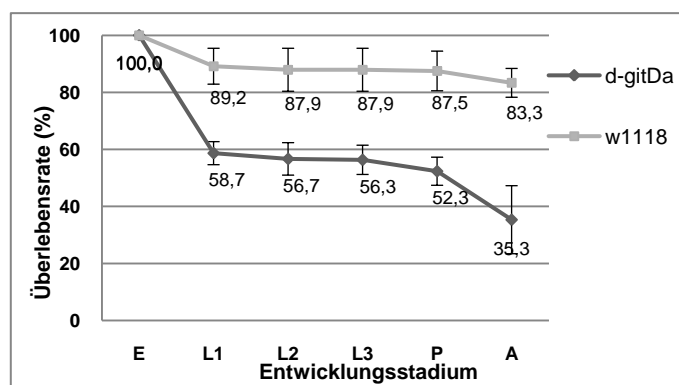


Abb. 30 Homozygote *d-git*^{Δa} Mutanten sind semi-letal und zeigen eine verringerte Entpuppungsrate

Die Bestimmung des Letalitätszeitpunktes wurde parallel für homozygote *d-git*^{Δa} Mutanten (n=205) und wildtypische Tiere (*w*¹¹¹⁸, n=240) in 3 unabhängigen Versuchen durchgeführt. Von den zu Beginn eingesetzten Embryonen (100%) schlüpfen lediglich 35 % der homozygoten *d-git*^{Δa} Mutanten, was signifikant niedriger ist als für die wildtypische Kontrolle mit 83 %. Es ist zu beachten, dass in

homozygoten *d-git*^{Δa} Mutanten über 40% der Embryonen nicht das Larvenstadium erreichen. (E Embryonen, Larvenstadien L1, L2 und L3, P Puppen und A geschlüpfte adulte Fliegen).

3.5.4.4. Homozygote *d-git*^{Δa} Fliegen sind semi-steril

Obwohl homozygote adulte Fliegen auftreten, konnte jedoch kein Stamm etabliert werden, der ausschließlich aus homozygoten *d-git*^{Δa} Tieren besteht. Dies kann einerseits daran liegen, dass homozygote *d-git*^{Δa} Fliegen steril sind oder andererseits daran, dass die Nachkommen homozygoter Tiere nicht entwicklungsfähig sind. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden wurden zunächst Sterilitätstests (Kap. 5.2.9) durchgeführt. Diese Daten zeigen, dass einige homozygote *d-git*^{Δa} Mutanten zwar fertil sind, die Fertilität jedoch in Weibchen und in Männchen herabgesetzt ist (Tabelle 7). Aus Kreuzungen von homozygoten *d-git*^{Δa} Weibchen mit homozygoten *d-git*^{Δa} Männchen resultierten zudem keine Nachkommen.

Tabelle 7 Auswertung des Sterilitätstests

Kreuzung		Anzahl der Nachkommen								Ø Anzahl der Nachkommen
♀ 1 <i>d-git</i> ^{Δa} x 3 <i>w</i> ⁻ ♂	30	30	15	0	0	0	1	53	7	14
♀ 1 <i>w</i> ⁻ x 3 <i>w</i> ⁻ ♂	0	83	62	105	107	110	129	24	0	62
♀ 3 <i>w</i> ⁻ x 1 <i>d-git</i> ^{Δa} ♂	120	0	140	89	195	96	0	13	0	65
♀ 3 <i>w</i> ⁻ x 1 <i>w</i> ⁻ ♂	110	75	166	140	162	171	202	151	120	130

Kreuzungen aus w⁻ oder homozygoten *d-git*^{Δa} Mutanten (Spalte 1) wurden auf 25°C gehalten und die Anzahl der Nachkommen pro Flasche bestimmt.

Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass homozygote *d-git*^{Δa} Tiere eine reduzierte Fertilität aufweisen. Die Ursache der Fertilitätsstörung wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht nachgegangen.

3.5.5. D-Git agiert wahrscheinlich nicht in funktionieller Redundanz mit RhoGAP15B

Die Analyse der mRNA Verteilung von putativen Arf-GAP kodierenden Genen in *Drosophila* hat gezeigt, dass *d-git* und *rhoGAP15B* spezifisch im somatischen und viszerale Mesoderm bereits während der fusionsrelevanten Stadien exprimiert werden. Die Tatsache, dass homozygote *d-git*^{Δa} Mutanten jedoch keine Fusionsdefekte aufweisen, könnte daraufhin deuten, dass D-Git während der Myoblastenfusion in funktioneller Redundanz mit RhoGAP15B wirkt.

3.5.5.1. Gleichzeitiger Verlust von *d-git* und *rhoGAP 15B* führt nicht zu Fusionsdefekten

Da für *rhoGap15B* keine Mutanten zur Verfügung standen, wurde zunächst die genomische Defizienz *Df(1)ED7374* verwendet, die den zytologischen Bereich 15A1-15E3 deletiert (Anhang Kap. 0). Homozygot defiziente Embryonen besitzen mehrkernige Muskeln, die jedoch eine abgerundete Form aufweisen und einen Defekt in der Anheftung an die Epidermis zeigen. Dieser Anheftungsdefekt ist wahrscheinlich auf die gleichzeitige Deletion des *if*-Gens zurückzuführen, welches für die α-Untereinheit der Integrin-Rezeptoren kodiert, die in *Drosophila* den stabilen Kontakt zwischen Muskeln und epidermaler Anheftungsstelle vermitteln (Bökel & Brown, 2000).

Erste Beobachtungen ließen jedoch erkennen, dass auch nach gleichzeitiger Deletion von *d-git* und *rhoGAP15B* mehrkernige Muskeln vorhanden sind, was darauf hinweist, dass D-Git und RhoGAP15B keine redundante Funktion während der Fusion der Myoblasten ausüben. Des Weiteren zeigen diese Doppelmutanten (*Df(1)ED7374; d-git^{Δa}*) ähnliche Muskelanheftungsdefekte wie in *Df(1)ED7374* Einzelmутanten, was darauf hindeuten könnte, dass der gleichzeitige Verlust von *d-git* keinen additiven Effekt auf den auf dem Verlust der Integrin-vermittelten Rezeptoren basierten Anheftungsphänotyp der Muskeln ausübt.

Zusätzlich zu der Defizienz wurde Gebrauch von gegen *rhoGAP15B* gerichteten RNAi-Linien (GD24678 und GD24679) gemacht. Die mesodermale Expression dieser RNAi-Linien im *twi*- bzw. im *mef2*- Muster im wildtypischen bzw. im *d-git^{Δa}* mutanten Hintergrund führte jedoch nicht zu Fusionsstörungen (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Experimenten kann geschlussfolgert werden, dass D-Git und RhoGAP15B während der Fusion der Myoblasten wahrscheinlich nicht redundant funktionieren.

3.5.5.2. RhoGAP15B interagiert nicht mit *Drosophila* Arf Protein

RhoGAP15B wurde als entferntes Homolog der ARAP Unterfamilie der Arf-GAPs identifiziert, die zusätzlich zu der ArfGAP-Domäne, der Ank-Wiederholungen und der PH-Domäne eine RhoGAP-Domäne besitzen (Gillingham und Munro, 2007). Im Gegensatz zu den Vertebraten Homologen, enthält *Drosophila* RhoGAP15B jedoch keine Arf-GAP-Domäne (siehe Abb. 25A). Um zu analysieren, ob die RhoGAP-Domäne möglicherweise die Funktion der Arf-GAP-Domäne übernehmen kann, wurde die direkte Interaktion der RhoGAP-Domäne (AS 756-986) mit den Arf Proteinen im Hefe-Zwei-Hybrid-System geprüft. Weder nach Fusion an die DNA-Bindedomäne (pGilda), noch nach Fusion an die Aktivierungsdomäne (pB42AD) konnte eine Interaktion mit D-Arf1, D-Arf2 oder D-Arf6 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Daten unterstützen somit nicht die Vorstellung, dass RhoGAP15B als ein Homolog der ARAP Unterfamilie als Arf-GAP agiert. Daher wurde weiterhin nur die Rolle des Arf-GAPS D-Git in der Muskelentwicklung analysiert.

3.5.6. D-Git lokalisiert an den Enden der Muskeln nahe der Muskelanheftungsstellen

Um die Proteinexpression von D-Git im Embryo zu analysieren, wurde die Herstellung eines Peptid-Antikörpers gegen D-Git in Auftrag gegeben (Pineda - Antikörper-Service, Berlin). Dieser Antikörper richtet sich gegen die AS TGGKHVPRWRKPTPK (AS 126 bis 140) von D-Git. Zunächst wurden verschiedene Verdünnungen (1:20 bis 1:1500) und Fixierungsmethoden (F-PBS- und Hitzefixierung, Kap. 5.3.1.) an wildtypischen Embryonen ausgetestet, um die optimalen Bedingungen des Antikörpers herauszufinden. Dabei hat sich herausgestellt, dass die besten Ergebnisse bei einer 1:50 Verdünnung in PBT mit einer zusätzlichen TSA-Verstärkung (TSA-Tyramid-System, Kap. 5.3.2.) an Formaldehyd-fixierten Embryonen erzielt werden können.

Erstaunlicherweise konnte bereits in Embryonen des synzytialen (Abb. 31A) und zellulären Blastoderm Stadiums (Abb. 31B, gestrichelter Pfeil) ein Signal detektiert werden, bei dem es sich wahrscheinlich um eine Färbung im Zellkern handelt. Interessanterweise scheint diese Kernfärbung auch in sich teilenden Zellen präsent zu sein (Abb. 31A). Des Weiteren ist eine Färbung in den zukünftigen Keimzellen zu beobachten, die im Stadium 5 kurz nach Ausbildung der Polzellen beginnt und während der gesamten Keimzellwanderung anhält (Abb. 31B-E, Pfeil). Auch hier scheint es sich um eine Lokalisation im Kern zu handeln. Für eine genaue Bestimmung dieser Kernlokalisierung sind Doppelfärbungen mit spezifischen Markern notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt wurden.

In situ-Hybridisierungen konnten zuvor die *d-git* mRNA im somatischen Mesoderm zwischen den fusionsrelevanten Stadien 11 und 15 nachweisen. Im Gegensatz konnte endogenes D-Git Protein jedoch frühestens in Embryonen des späten Stadium 15 bis einschließlich Stadium 17 detektiert werden, in denen die Fusion der Myoblasten bereits abgeschlossen ist. Interessanterweise konzentrierte sich D-Git in diesen Stadien an den Enden der Muskeln in der Nähe der Muskelanheftungsstellen (Abb. 31D, E und F, Kreis, Pfeilkopf). Doppelfärbungen mit dem β 3-Tubulin-Antikörper konnten zudem bestätigen, dass D-Git auf Seite der Muskeln und nicht auf der Seite der epidermalen Anheftungsstelle lokalisiert (Abb. 31F). Damit unterstützen die Proteinexpressionsdaten die Vermutung, dass D-Git eher für die späten Aspekte der Myogenese wie die Wegfindung der Muskeln oder die Anheftung an die Epidermis benötigt wird, als dass es eine Rolle bei der Fusion der Myoblasten spielt. Jedoch kann an dieser Stellen nicht ausgeschlossen werden, dass das D-Git Protein bereits in fusionierenden Myoblasten vorhanden ist und aufgrund eines niedrigen Expressionslevel oder einer Kurzlebigkeit des Proteins nicht nachgewiesen werden kann.

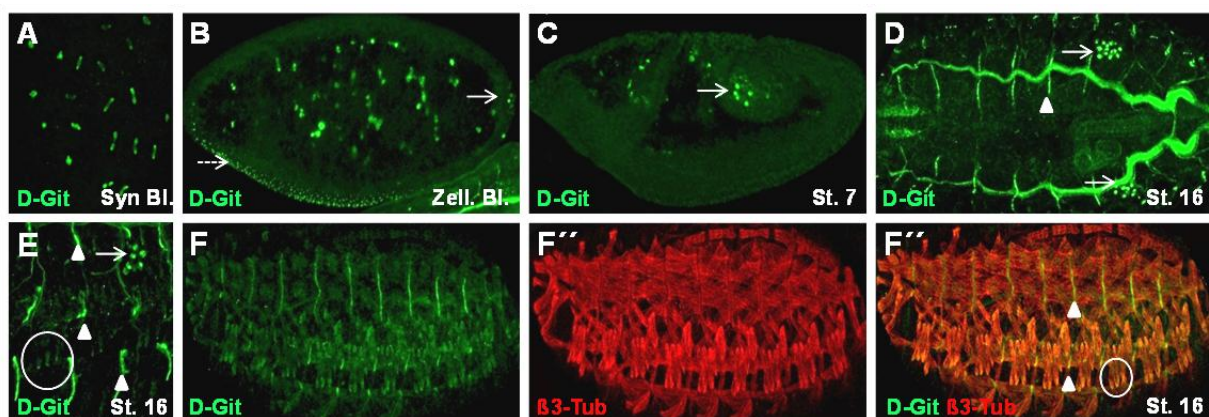


Abb. 31 Endogene D-Git Proteinexpression im *Drosophila* Embryo

Färbungen mit dem Anti-D-Git-Antikörper an *whole mount* Embryonen (grün, A-D) und Doppelfärbung mit dem β 3-Tubulin-Antikörper (rot) (F). Anterior ist links, dorsal ist oben. A-C und E, F Lateralansicht, D Dorsalansicht. Der D-Git Antikörper detektiert schon sehr früh ein Signal in den Zellkernen des synzytialen (A) und zellulären Blastoderms (gestrichelter Pfeil, B). Expression von D-Git in den Polzellen im (Pfeil), den Keimzellen der zukünftigen Gonaden, beginnend im Stadium 5 (B), während der Gastrulation (C) bis einschließlich Stadium 16 (D, E). In der Dorsalansicht ist die paarige Anordnung der Keimzellen zu erkennen (D). Anreicherung von D-Git an den Muskelanheftungsstellen (Pfeilköpfe, Kreis; D, E und F). Kollokalisierung von D-Git mit β 3-Tubulin an den Enden der Muskeln (F, F', F'')

3.5.7. Untersuchungen zur Funktion von D-Git als Arf-GAP – D-Git als möglicher Regulator für D-Arf6

Am N-terminalen Ende von D-Git befindet sich die charakteristische GAP-Domäne, welche die Hydrolyse des an das Arf-Protein gebundene GTP katalysiert. Für die Säugetier Proteine Git1/2 konnte *in vitro* katalytische Aktivität gegen alle Arf-GTPasen nachgewiesen werden (Vitale et al., 2000), jedoch haben *in vivo* Analysen gezeigt, dass Git1/2 hauptsächlich als Arf-GAPs für Arf6 wirken (Turner et al., 1999; Zhao et al., 2000). Im Gegensatz lokalisiert die kürzere Spleiß-Form von Git2 am Golgi-Apparat, wo es als Regulator für Arf1 fungiert (Mazaki et al., 2001). Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob das *Drosophila* Homolog D-Git während der Myogenese die Aktivität von D-Arf1 oder von D-Arf6 kontrolliert.

3.5.7.1. *arf6*¹, *d-git*^{Δa} Doppelmutanten zeigen einen verstärkten Defekt in der Wegfindung und Ausrichtung der ventralen Muskeln

Um herauszufinden, ob *d-git* während der Muskelentwicklung mit *d-arf6* interagiert, wurden mittels meiotischer Rekombination *d-git*^{Δa}, *d-arf6*¹ Doppelmutanten hergestellt (Kap. 5.2.5.). Anschließend wurde die Muskulatur der *d-git*^{Δa} und *arf6*¹ Einzelmутanten und der *d-git*^{Δa}, *d-arf6*¹ Doppelmutanten mit Hilfe einer β3-Tubulin-Antikörperfärbung untersucht. Zunächst konnte eindeutig festgestellt werden, dass auch der gleichzeitige Verlust von *d-arf6* und *d-git* nicht zu Fusionsdefekten führt und die Muskulatur in den Doppelmutanten relativ wildtypisch erscheint. Es ließ sich jedoch erkennen, dass *d-git*^{Δa}, *d-arf6*¹ Doppelmutanten im Vergleich zu den *d-git*^{Δa} und *arf6*¹ Einzelmутanten (Abb. 32B, C) einen stärkeren Defekt in der Orientierung und Ausrichtung der ventralen Muskeln aufweisen (Abb. 32D-F; Abb. 34). Während in ca. 30% der *d-git*^{Δa} Einzelmутanten die ventralen VO5/6 Muskeln in maximal 2 Segmenten zu weit auf die Mittellinie zuwachsen, sich jedoch nicht in der Mitte treffen, wachsen die VO5/6 Muskeln in über 55% der *d-git*^{Δa}, *d-arf6*¹ Doppelmutanten in bis zu 5 Segmenten über die Mittellinie hinaus und treffen sich in der Mitte (Abb. 32F, Abb. 33). Bei genauerer Betrachtung lässt sich zudem erkennen, dass die Orientierung, Lage und Form einzelner Muskeln verändert ist (Abb. 34). Im Gegensatz zu den Einzelmутanten sind *d-arf6*, *d-git* Doppelmutanten zudem homozygot letal.

Zusammengefasst führt der gleichzeitige Verlust von *d-git* und *d-arf6* zu einem verstärkten Defekt in der Wegfindung und der ventralen Muskeln, woraus geschlussfolgert werden kann, dass D-Git *in vivo* in der Regulation von D-Arf6 involviert ist.

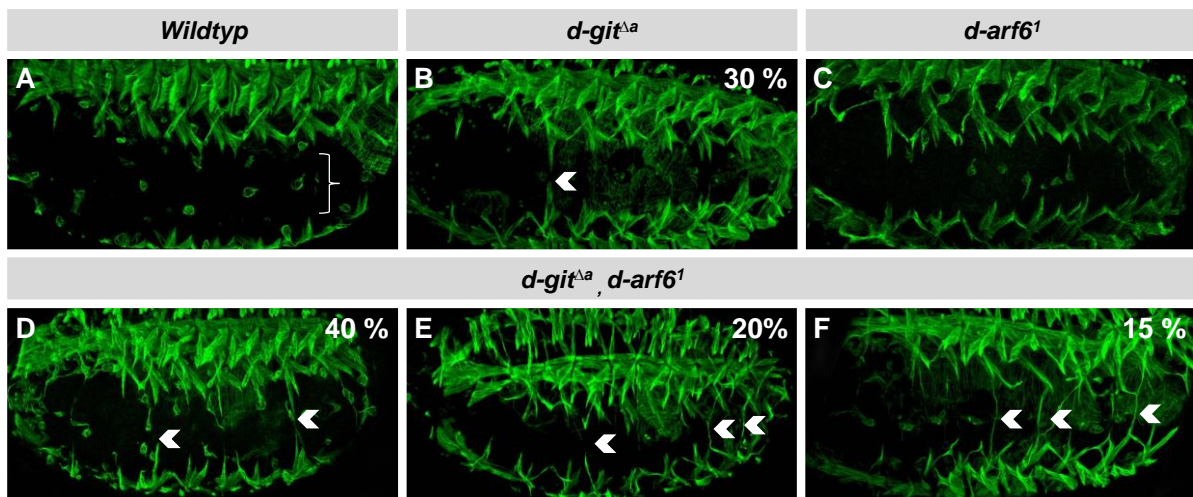


Abb. 32 $d\text{-git}^{\Delta a}$, $arf6^1$ Doppelmutanten zeigen einen verstärkten „Bypass“-Phänotyp

B3-Tubulin Antikörperfärbung an Stadium 16 Embryonen. Ventral bzw. Ventrolateralansicht. Anterior ist links. Im Wildtyp erreichen die ventrolateralen Muskeln niemals die Mittellinie, sondern halten einen gleichmäßigen Abstand ein (Klammer, A). In zygotischen $d\text{-git}^{\Delta a}$ Mutanten wachsen die ventralen VO Muskeln in ein bis zwei Segmenten zu weit auf die Mittellinie zu (Pfeilkopf, B), während $d\text{-arf6}^1$ Mutanten ein wildtypisches Muster zeigen (C). In $d\text{-git}^{\Delta a}$, $d\text{-arf6}^1$ Doppelmutanten wachsen die ventralen VO5 und 6 Muskeln in zwei bis fünf Segmenten zu weit auf die Mittellinie zu (Pfeilkopf; D, E und F), bei dem es bei der stärksten Ausprägung zum Treffen der Muskeln an der ventralen Mittellinie kommt (F). Die Häufigkeit der Phänotypen ist in Prozenten angegeben

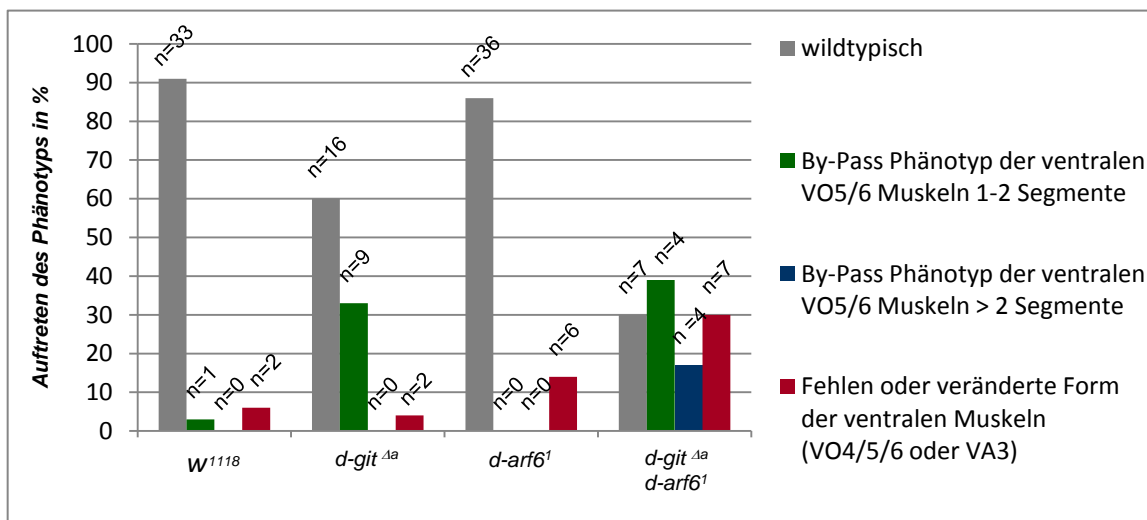


Abb. 33 Der Anteil der fehlgeleiteten und missgeformten Muskeln ist in $d\text{-git}^{\Delta a}$, $d\text{-arf6}^1$ Doppelmutanten erhöht

Graphische Darstellung des prozentualen Anteils an Embryonen mit zur Mittellinie fehlgeleiteten ventralen Muskeln in 1 bis 2 Segmenten (grün), bzw. in mehr als zwei Segmenten (blau), oder mit missgeformten ventralen VO4/5/6 oder VA3 Muskeln (rot) von w^{1118} Embryonen als wildtypische Kontrolle (n=35; Spalte 1), von $d\text{-git}^{\Delta a}$ Einzelmutanten (n=27; Spalte 2), von $d\text{-arf6}^1$ Einzelmutanten (n=42; Spalte 3) und von $d\text{-git}^{\Delta a}$, $d\text{-arf6}^1$ Doppelmutanten (n=26; Spalte 4). Die Anzahl der analysierten Embryonen pro Genotyp entspricht 100 %, n gibt die Anzahl der Embryonen pro Genotyp und beobachtetem Phänotyp an. In $d\text{-git}^{\Delta a}$, $d\text{-arf6}^1$ Doppelmutanten ist der Anteil der Embryonen mit bis auf die Mittellinie zuwachsenden Muskeln (grüne und blaue Balken) (39 % + 17 % = 56 %) im Vergleich zu w^{1118} (3 %), $d\text{-git}^{\Delta a}$ (33 %) oder $d\text{-arf6}^1$ (0 %) erhöht. Fehlgeleitete Muskeln in mehr als zwei Segmenten (blaue Balken, 17 %) treten nur in $d\text{-git}^{\Delta a}$, $d\text{-arf6}^1$ Doppelmutanten auf. Der Anteil der Embryonen, in denen ventrale Muskeln eine veränderte Gestalt annehmen, ist in $d\text{-git}^{\Delta a}$, $d\text{-arf6}^1$ Doppelmutanten (30%) erhöht (w^{1118} = 6 %, $d\text{-git}^{\Delta a}$ = 4 %, $d\text{-arf6}^1$ = 14 %).

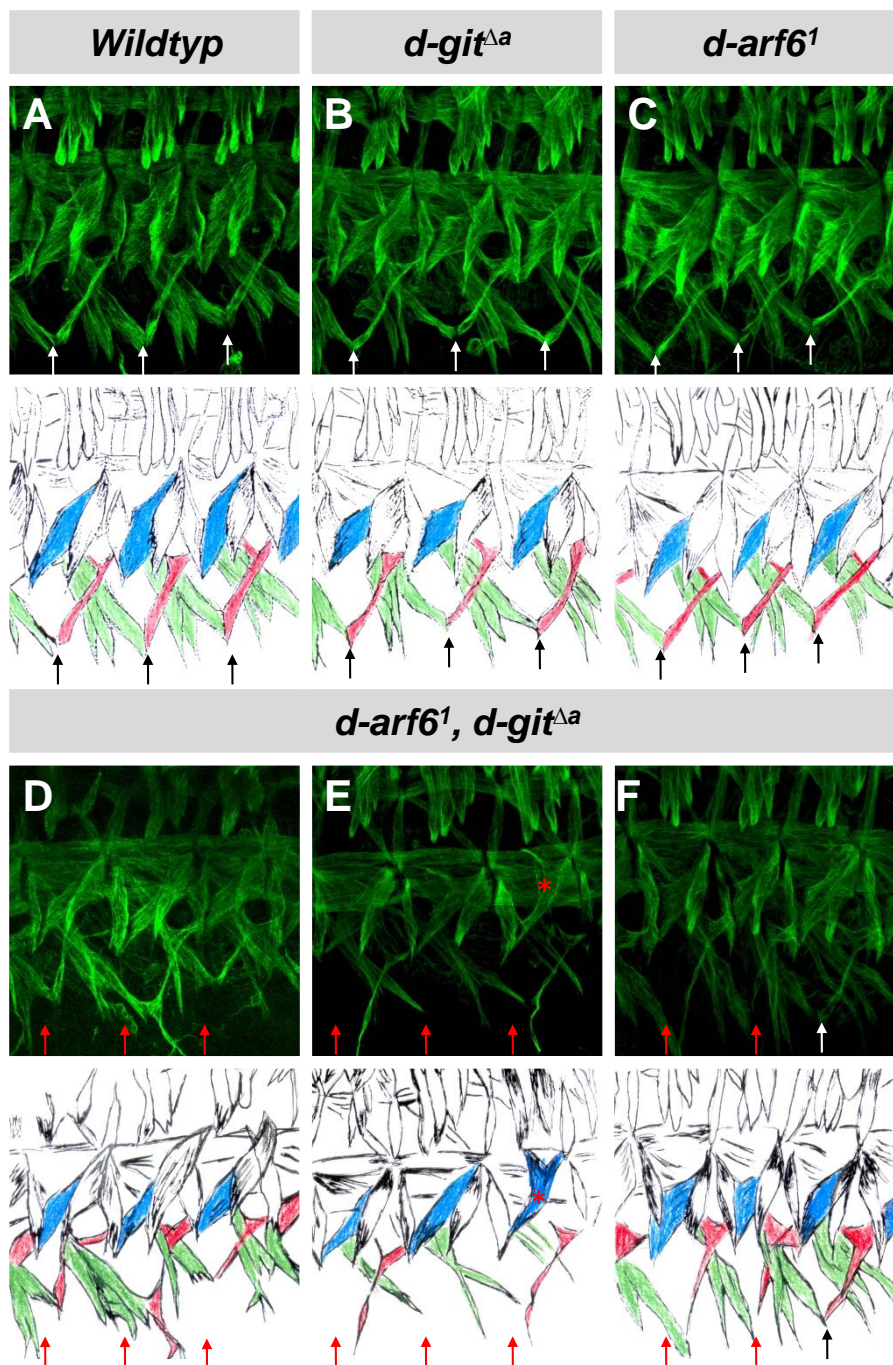


Abb. 34 In $git^{\Delta a}$, $d-arf6$ Mutanten ist die Orientierung und Lage der ventralen Muskeln verändert

ß3-Tubulin Antikörperfärbung an Stadium 16 Embryonen. Gezeigt sind die ventralen Muskelgruppen. Anterior ist links. Schematische Darstellung der Muskeln VA1 (blau), VA3 (rot) und VO6,5 und 4 (grün, von links nach rechts). Im Wildtyp (A), sowie in den $d-arf6^1$ (C) und größtenteils in den $d-git^{\Delta a}$ (B) Einzelmутanten strecken sich die ventralen Muskeln VO4, 5 und 6 (grün) nahezu parallel in ventral-posteriore Richtung. Der VO4 Muskel reicht dabei von dem anterioren Ende eines Segmentes bis in die Mitte des posterior folgenden Segmentes hinein, wo es auf den ventral-anterior orientieren VA3 Muskel (rot) trifft (weiße, bzw. schwarze Pfeile). VO4 und VA3 Muskeln ein verbreitertes Muskelende aus. In $d-git^{\Delta a}$, $d-arf6^1$ Doppelmutanten wachsen die VO4 und VA3 Muskeln darüber hinaus und bilden weitere Verzweigungen (D). Des weiteren variiert die Lage und Form des VA3 Muskels (rot), erscheint dabei verkürzt (D) oder verlängert (E, F). Veränderte Form (D) oder Fehlen einzelner VO4, 5 oder 6 Muskeln (grün) (D, E). In einigen Embryonen ist die Form des VA1 (blau) oder VA2 Muskels verändert (Stern, E). Rote Pfeile markieren die Segmente, in denen die VA3 und VO4 Muskeln nicht korrekt an ihre gemeinsamen Anheftungsstelle adhären.

3.5.7.2. *d-git*^{Δa}; *arf1* Doppelmutanten zeigen den *d-git*^{Δa} mutanten Phänotyp

Um eine mögliche genetische Interaktion mit *d-arf1* während der Muskelentwicklung aufzuklären, wurden weiterhin *d-git*^{Δa}, *d-arf1* Doppelmutanten mit Hilfe der *d-arf1* Defizienz *Df(3L)ED5017* hergestellt (Kap. 5.2.5.). Die phänotypische Analyse der Muskulatur hat gezeigt, dass die VO5 oder VO6 Muskeln in *d-git*^{Δa}; *Df(3L)ED5017* Doppelmutanten ähnlich wie in *d-git*^{Δa} Einzelmутanten in ein bis zwei Segmenten zu weit auf die Mittellinie zuwachsen, sonst jedoch keine weiteren Defekte auftreten (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass der zusätzliche Verlust von zygotischem *d-arf1* zu keiner Verstärkung des Phänotyps führt. Somit ist D-Git während der Wegfindung der Muskeln wahrscheinlich nicht in der Regulation von D-Arf1 involviert.

3.5.7.3. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte keine Interaktion mit einem Arf Protein festgestellt werden

Arf-GAP Proteine fungieren als Regulator der Arfs, in dem sie mit Hilfe der katalytischen GAP-Domäne die Hydrolyse des gebundenen GTPs einleiten. Die Arf-GAP-Domäne besteht aus einem charakteristischen Zink-Finger-Motif sowie weiteren direkt benachbarten Aminosäuren, welche direkt mit der Switch I und II Region der GTP-gebundenen Form der Arf-GTPasen interagiert (Cuckierman et al., 1995; Goldberg, 1999; Mandiyan et al., 1999).

Die direkte Interaktion zwischen D-Git und den *Drosophila* Arf 1, 2 und 6 wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (Kap. 5.5) überprüft. Dabei wurde einerseits das vollständige D-Git Protein (D-Git-fl, 732 AS, Abb. 35A) und andererseits ein 157 AS großes Teilfragment von D-Git (D-Git-GAP, Abb. 35A) verwendet, welches ausschließlich die katalytische Arf-GAP-Domäne beinhaltet. *Drosophila* Arf Proteine lagen entweder in der GDP- oder der GTP-gebundenen Form vor. Es konnte jedoch weder mit D-Git-GAP (Abb. 35B) noch mit Git-fl (Abb. 35C) eine Interaktion mit *Drosophila* Arf 1, 2 oder 6 nachgewiesen werden. Es machte zudem keinen Unterschied, ob D-Git bzw. die nur die GAP-Domäne von D-Git oder die Arf-Proteine an die DNA-Bindedomäne oder die Aktivierungsdomäne fusioniert wurden.

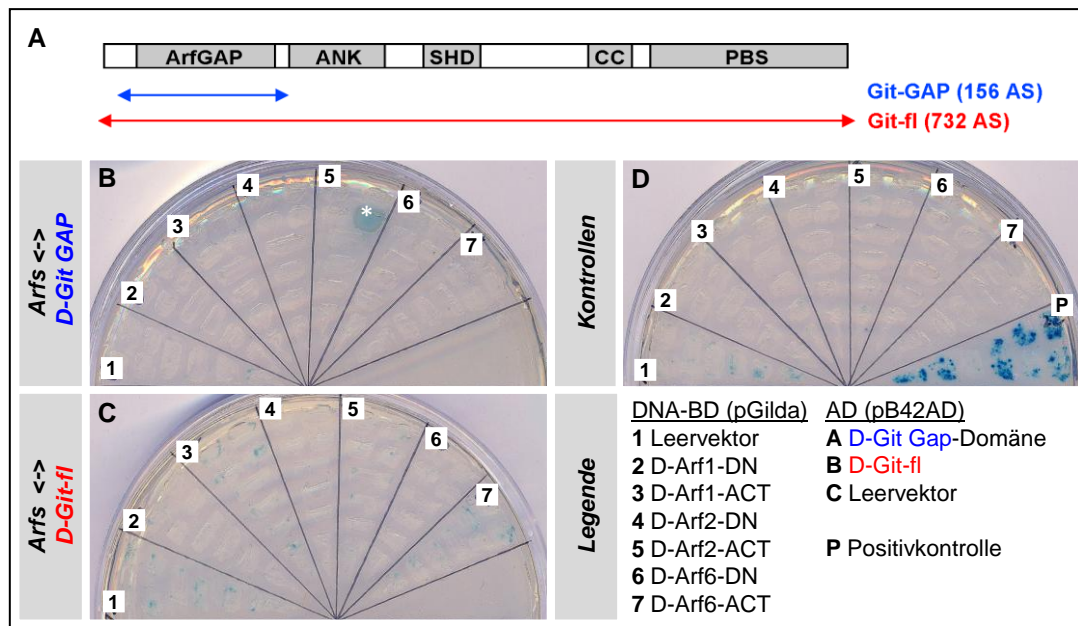


Abb. 35 Keine Interaktion zwischen D-Git und D-Arf1, 2 oder 6 im Hefe-Zwei-Hybrid-System

A) Schema des D-Git Proteins und der Varianten, die für den Interaktionstest eingesetzt wurden. Das Schema zeigt die funktionellen Domänen von D-Git: katalytische Arf-GAP-Domäne (Arf-GAP), die Ankyrin-Wiederholungen (ANK), die Spa-Homologie Domäne (SHD), die Coiled-Coiled-Region (CC) und die C-terminale Paxillin-Bindestelle (PBS). Darunter sind die für den Hefe-Zwei-Hybrid-Test eingesetzten Fragmente markiert: das 732 AS große vollständige D-Git-Protein (**D-Git-fl**) und das aus der katalytischen GAP-Domäne bestehende, 157 AS große Fragment (**D-Git-GAP**) (AS 19-175). **B-D**) Exemplarische Aufnahmen des Interaktionstests. Gezeigt sind jeweils 8 Hefe-Kotransformanten nach drei Tagen Inkubation auf Galaktose und X-Gal-haltigen Induktionsplatten. Positive Interaktion wird durch Wachstum und Blaufärbung angezeigt. D-Git-GAP (**B**) bzw. D-Git-fl (**C**) wurden an die B42-Aktivierungsdomäne (AD), Arf Proteine wurden an die DNA-Bindungsdomäne (BD) gekoppelt. Kotransformanten aus AD_D-Git-GAP (**B**) bzw. AD_D-Git-fl (**C**) mit BD (1), BD_D-Arf1-T31N (2), BD_D-Arf1-Q71L (3), BD_D-Arf2-T31N (4), BD_D-Arf2-Q71L (5), BD_D-Arf6-T27N (6), BD_D-Arf6-Q67L (7). Es konnte keine Interaktion festgestellt werden. **D**) Negativkontrollen mit ausschließlich AD (**D** 1-7), sowie laborinterne Positivkontrolle BD-RI und AD-Duf (**D**-P)

3.5.7.4. Die mesodermale Überexpression von D-GitΔGAP oder der isolierten GAP-Domäne hat keinen Einfluss auf die Muskelentwicklung

Nachdem die bisherigen Untersuchungen das Ziel hatten, die Spezifität der Arf-GAPs für ein bestimmtes Arf Protein zu bestimmen, sollte im Folgenden durch Überexpressionanalysen die Funktion von D-Git als Arf-GAP generell aufgeklärt werden.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Überexpression einer D-Git Variante mit deletierter Arf-GAP Domäne einen Defekt in der Muskelentwicklung hervorruft. Dazu wurde zunächst ein pUAS-Konstrukt hergestellt, in dem die Arf-GAP-Domäne (AS 31-168) von D-Git deletiert ist und anschließend transgene Fliegen mit Hilfe der P-Transposase generiert (UAS-*d-git*ΔGAP, Abb. 36). Die Überexpression von D-GitΔGAP in dem Mesoderm führte jedoch weder zu Fusionsstörungen noch zu Defekten in der Wegfindung oder Anheftung der Muskeln (Daten nicht gezeigt, Übersicht Abb. 36). Somit bewirkt die mesodermale Überexpression von D-GitΔGAP zumindest keinen dominant-negativen Effekt.

Arf-GAPs katalysieren die Hydrolyse des gebundenen GTPs und bewirken damit eine Inaktivierung des Arf Proteins. Daher stellt sich die Frage, ob nicht der Verlust, sondern die Überexpression der Arf-GAP Domäne von D-Git zu Defekten führt. Um dies zu analysieren wurde die Arf-GAP-Domäne von D-Git zusammen mit einem C-terminalen GFP in den Transformationsvektor pUAS_t kloniert und transgene Fliegen etabliert (UAS-*d-git-gap-GFP*, Kap. 5.2.3, Abb. 36). Die mesodermale Überexpression der Arf-GAP-Domäne von D-Git führte jedoch zu keinen ersichtlichen Störungen in der Muskulatur (Daten nicht gezeigt, Abb. 36). Anti-GFP Antikörperfärbungen ließen zudem erkennen, dass die Arf-GAP-Domäne während der Stadien 11-14 zunächst zytoplasmatisch in den Muskeln vorliegt, anschließend jedoch nicht mehr detektiert werden kann. Es konnte keine Anreicherung an den Enden der Muskeln beobachtet werden (Daten nicht gezeigt, Abb. 36). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die isolierte GAP-Domäne frühzeitig abgebaut wird und möglicherweise daher keinen Überexpressionsphänotyp bewirkt.

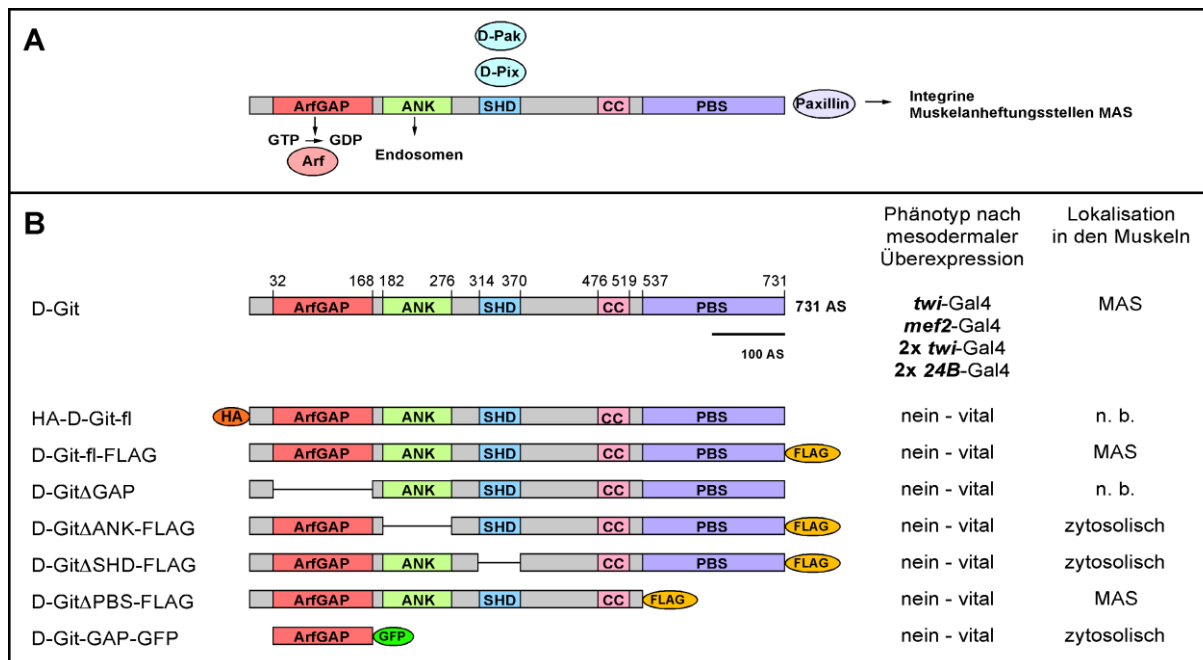


Abb. 36 Hergestellte D-Git Varianten und deren phänotypische Auswertung

(A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von D-Git und den putativen Interaktionspartnern: katalytische Arf-GAP-Domäne (Arf-GAP), Ankyrin-Wiederholungen (ANK), die Spa-Homologie Domäne (SHD), Coiled-Coiled-Region (CC) und die C-terminale Paxillin-Bindestelle (PBS). Zahlen geben Beginn und Ende der funktionellen Domänen nach ExPASy Prosite (<http://au.expasy.org/prosite>) in Aminosäuren (AS) an. CC-Region wurde nach dem Multicoil Programm (<http://groups.csail.mit.edu/multicoil>) bestimmt.

Die Arf-GAP-Domäne katalysiert die Hydrolyse von GTP gebunden an Arf-GTPasen. ANK vermitteln in Vertebraten die intrazelluläre Lokalisation an Endosomen. Über die SH-Domäne interagiert Vertebraten Git mit dem Austauschfaktor Pix und indirekt mit der Kinase Pak. Die PBS vermittelt die Interaktion mit dem Adhäsions-assoziierten Molekül Paxillin. Paxillin lokalisiert in *Drosophila* in Abhängigkeit von Integrinen an den Muskelanheftungsstellen.

(B) Hergestellte D-Git-Varianten mit N-terminalen HA-Anhang oder C-terminalen FLAG-Anhang: Deletion der ARF-GAP Domäne (D-GitΔGAP), der ANK-Wiederholungen (D-GitΔANK-FLAG), der SHD (D-GitΔSHD-FLAG) und der PBS (D-GitΔPBS-FLAG). Arf-GAP-Domäne fusioniert an GFP (D-Git-GAP-GFP). Zusammenfassung des Phänotypes nach Überexpression der D-Git Varianten mit Hilfe verschiedener mesodermaler Treiberlinien und der Lokalisation der D-Git Varianten in den Muskeln mit Hilfe einer anti-FLAG oder anti-GFP Färbung (weitere Abkürzungen: n. b. nicht bestimmt).

Im Folgenden sollen weitere Interaktionspartner von D-Git analysiert werden, um die Funktion von D-Git während der Muskelentwicklung näher zu charakterisieren.

3.5.8. Die Interaktion mit dem Adaptormolekül Paxillin scheint nicht für die Lokalisation von D-Git an die Muskelanheftungsstellen sowie für die Wegfindung der Muskeln essentiell zu sein

Säuger Git, auch als p95-Paxillin-Kinase-Linker (p95-PKL) bekannt, wurde als ein Adaptorprotein entdeckt, welches die Verbindung zwischen dem fokalen Adhäsionsmolekül Paxillin und dem Pak-interagierendem Austauschfaktor (Pix) und der p21-aktivierten Kinase (Pak) vermittelt (Turner, 1999). Bahri et al. (2009) konnten zeigen, dass auch *Drosophila* Git zusammen mit D-Pix und D-Pak in einem Komplex vorliegt und die Lokalisation von *Drosophila* Pak zu den Integrin-haltigen Muskelanheftungsstellen von D-Git abhängt. Interessanterweise lokalisiert *Drosophila* Paxillin (Pax) wie die Komponenten des D-Git/D-Pix/D-Pak-Komplexes an den Muskelanheftungsstellen (Harden et al., 1996; Hicks et al., 2001; Wheeler et al., 2001; Bahri et al., 2009), was darauf hindeuten könnte, dass D-Git über die direkte Interaktion mit Paxillin in der Lokalisation des konservierten Komplexes fungiert. Die Überexpression von Paxillin in den Flügel-Imaginalscheiben resultiert zudem in einem sogenannten „wing-Blister“ oder Flügelblasen-Phänotyp (Chen et al., 2005), welcher indikativ für eine reduzierte Integrin-vermittelte Adhäsion der beiden Flügelepithelien ist (Brabant et al. 1993). Dieser Phänotyp kann durch die Herausnahme von D-Pix abgeschwächt werden, was weiterhin darauf hinweisen könnte, dass der D-Git/D-Pix/D-Pak-Komplex stromabwärts von Paxillin liegt (Chen et al., 2005). In den folgenden Abschnitten sollte daher geklärt werden, ob Paxillin während der Entwicklung der Muskulatur in der Regulation des D-Git/D-Pix/D-Pak-Komplexes involviert ist.

3.5.8.1. D-Git interagiert im Hefe-Zwei-Hybridsystem mit Paxillin

Zunächst wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybridsystems überprüft, ob D-Git mit *Drosophila* Paxillin physikalisch interagieren kann. In drei unabhängigen Experimenten konnte bereits nach zwei Tagen eine Blaufärbung der kotransformierten Kolonien und somit eindeutig eine direkte Interaktion zwischen D-Git und Paxillin festgestellt werden (Abb. 37).

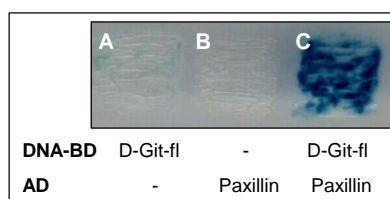


Abb. 37 D-Git interagiert mit Paxillin

Exemplarische Aufnahme des Interaktionstest zwischen D-Git und Paxillin. Gezeigt sind Kotransformanten nach drei Tagen Inkubation auf Galaktose und X-Gal-haltigen Induktionsplatten. Interaktion wird durch Wachstum und Blaufärbung angezeigt. D-Git-fl wurde an DNA-Bindedomäne (BD_D-Git-fl) und Paxillin an die B42AD-Aktivierungsdomäne (AD_Paxillin) fusioniert. Interaktion findet ausschließlich zwischen BD_D-Git-fl und AD_Paxillin (C), aber nicht bei Verwendung des jeweiligen anderen leeren Vektors statt (A, B).

3.5.8.2. *d-git* zeigt eine genetische Interaktion mit der *paxillin* Defizienz *Df(2L)ED1231*, jedoch nicht mit den hypomorphen Allelen *pax*^{f03922} und *pax*^{c06996}

Um herauszufinden, ob D-Git und Paxillin während der Anheftung bzw. der Wegfindung der Muskeln kooperieren, wurde die Auswirkung des gleichzeitigen Verlustes von *d-git* und *paxillin* auf die somatische Muskulatur untersucht. Da zu dem Zeitpunkt dieser Arbeit keine molekular charakterisierten *paxillin* Nullmutanten zur Verfügung standen, wurden für dieses Experiment zunächst die genomische Defizienz *Df(2L)ED1231* betrachtet, die neben *paxillin* 30 weitere Gene deletiert (Anhang, Kap. 0). Homozygot defiziente Embryonen zeigen keine drastischen Störungen in der Muskulatur, obwohl in einzelnen Embryonen die lateralen Transversal-Muskeln (LT1-3) ihre epidermale Anheftungsstelle verpassen und etwas zu weit ventral projizieren (Abb. 38B; Abb. 39C). In Embryonen, in denen die *d-git*^{Δa} Deletion auf das defiziente Chromosom rekombiniert wurde (Kap. 5.2.6) (*Df(2L)ED1231*, *d-git*^{Δa}), konnte eine deutliche Steigerung dieses Zielfindungsphänotyps festgestellt werden (Abb. 38C; Abb. 39D). Zudem konnte beobachtet werden, dass die Mehrheit der ventralen Muskeln (Muskeln VO1 bis 6, VA1 bis 3) sich stark in Richtung der ventralen Mittellinie streckt und eine veränderte Gestalt annimmt (Abb. 38C'; Abb. 39D). Um zu analysieren, ob die mit der Defizienz beobachtete genetische Interaktion tatsächlich auf dem Verlust von *paxillin* beruht, wurden daraufhin die P-Element Insertionen *pax*^{f03922} und *pax*^{c06996} verwendet, welche in dem ersten Intron von *paxillin* liegen und als hypomorphe *paxillin* Allele mit einem reduzierten mRNA Level beschrieben wurden (Chen et al., 2008). Um das verfügbare Transkriptionslevel von *paxillin* weiter zu reduzieren, wurden die P-Elemente in Transheterozygose zu der Defizienz *Df(2L)ED1231* betrachtet. Die phänotypische Analyse dieser Embryonen hat zunächst gezeigt, dass *pax*^{f03922} bzw. *pax*^{c06996} transheterozygot zu der Defizienz keine Defekte in der Muskulatur verursachen (Abb. 38D bzw. E), was an der maternalen Komponente von *paxillin* (Daten nicht gezeigt) liegen könnte. Bei einem Zusammenspiel mit D-Git während der Muskelwegfindung sollte in *pax*, *d-git*^{Δa} Doppelmutanten dennoch ein zu *d-git*^{Δa} Einzelmutanten verstärkter Phänotyp auftreten. Um dies zu analysieren, wurden im Folgenden *pax*^{f03922}, *d-git*^{Δa} und *pax*^{c06996}, *d-git*^{Δa} Doppelmutanten mit Hilfe meiotischer Rekombination (Kap. 5.2.6) hergestellt. Embryonen, die jeweils das hypomorphe P-Element Allel transheterozygot zu der Defizienz aufweisen und homozygot für *d-git*^{Δa} sind, zeigen jedoch den typischen *d-git*^{Δa} mutanten Phänotyp mit verlängerten VO5/6 Muskeln in ein bis zwei Segmenten des Embryos (Abb. 38E und G). Somit sind die bei der Verwendung der homozygoten Defizienz beobachteten Wegfindungsstörungen wahrscheinlich nicht auf eine Interaktion mit *paxillin* zurückzuführen, sondern beruhen auf der Anwesenheit eines weiteren für die Wegfindung der Muskeln relevanten Genes. Interessanterweise befindet sich in dieser Defizienz das Gen *derailed* (*drl*), für welches bereits eine Rolle in der Erkennung der ventralen Anheftungsstellen der lateralen Muskeln LT1-3 gezeigt werden konnte (Calahan et al., 1996). Zukünftige Studien sollten daher ein Zusammenwirken der Rezeptortyrosinkinase Drl und D-Git während der Zielfindung der lateralen und ventralen Muskeln adressieren.

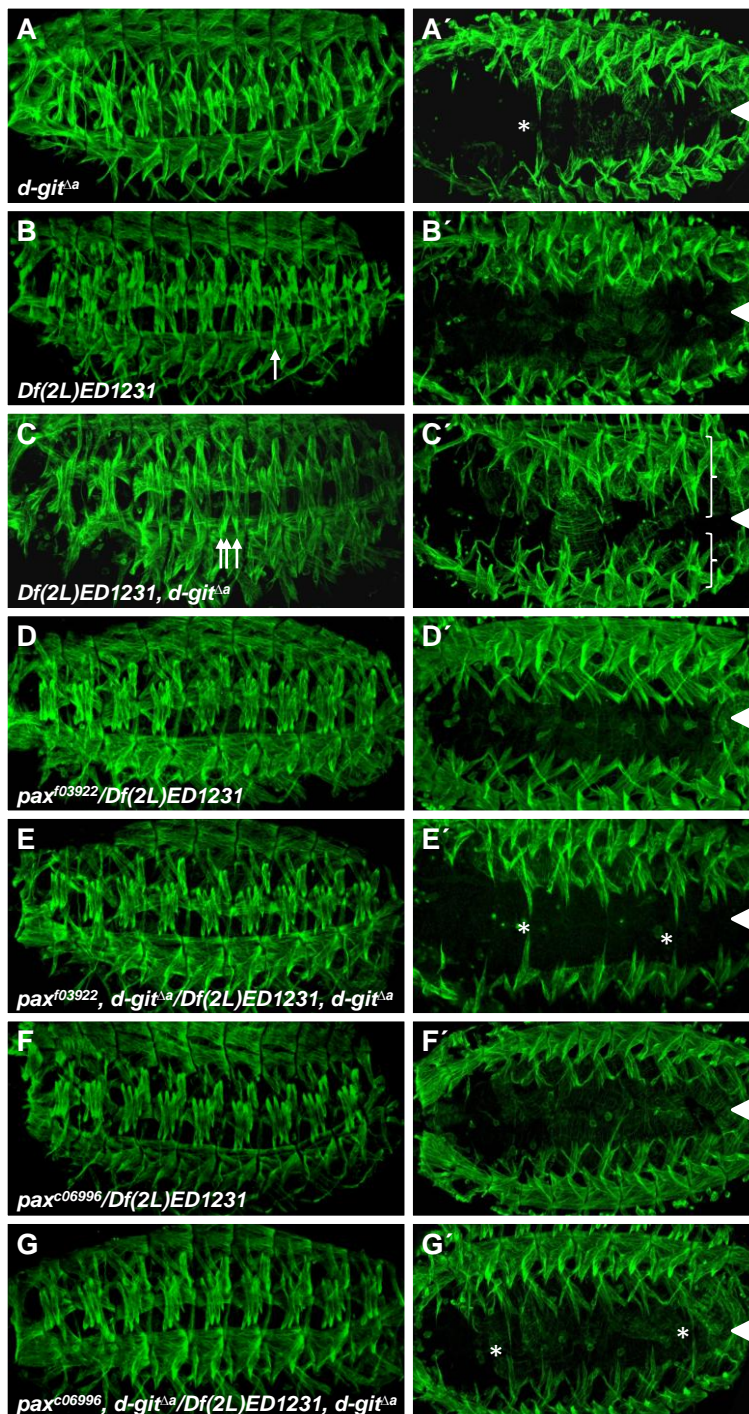


Abb. 38 Phänotypische Auswertung der *pax*, *d-git*^{Δa} Doppelmutanten

ß3-Tubulin-Färbung an Stadium 16 Embryonen. Anterior ist links. Rechte Spalte: Lateralansicht; Linke Spalte: Ventralansicht.

Wegfindungsphänotyp von *d-git*^{Δa} Einzelmutanten (Stern, **A** und **A'**). In homozygot defizienten *Df(2L)ED1231* Embryonen ist gelegentlich einer der LT Muskeln verlängert (Pfeil, **B**), die ventralen Muskeln sind nahezu unverändert (**B'**). In *Df(2L)ED1231*, *d-git*^{Δa} Doppelmutanten wachsen in nahezu jedem Segment zwei bis drei der LT Muskeln auf der ventralen Seite über ihre eigentliche Anheftungsstelle hinaus (Pfeile, **C**). Auch die ventralen Muskeln strecken sich zu stark in ventraler Richtung (Klammer in **C'**) und scheinen ungeordnet. *pax*^{f03922} (**D**, **D'**) bzw. *pax*^{c06996} (**F**, **F'**) in Transheterozygose zu der Defizienz *Df(2L)ED1231* zeigen ein wildtypisches Muskelmuster, während *pax*^{f03922}, *d-git*^{Δa}/*Df(2L)ED1231*, *d-git*^{Δa} (**D**, **D'**) und *pax*^{c06996}, *d-git*^{Δa}/*Df(2L)ED1231*, *d-git*^{Δa} (**G**, **G'**) Doppelmutanten den *d-git*^{Δa} mutanten Phänotyp (Stern) zeigen. Der Pfeilkopf gibt die ventrale Mittellinie an.

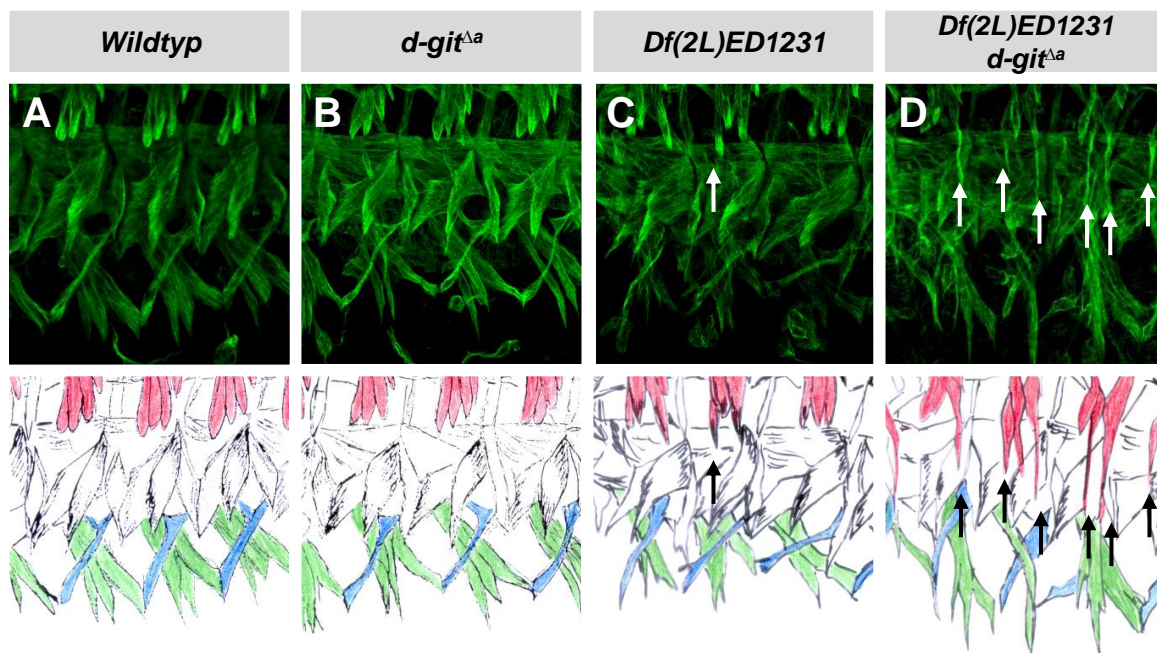


Abb. 39 Darstellung des „Bypass“ Phänotyps in *Df(2L)ED1231,d-git^{Δa}* Doppelmutanten

β3-Tubulin Antikörperfärbung an Stadium 16 Embryonen und schematische Darstellung der Muskeln: LT1-4 (rot), VA3 (blau) und VO6,5 und 4 (grün, von rechts nach links). Gezeigt sind die ventralen Muskelgruppen. Anterior ist links, dorsal oben.

Im Wildtyp (A), sowie größtenteils in den *d-git^{Δa}* (B) Einzelmутanten strecken sich die ventralen Muskeln VO4, 5 und 6 (grün) nahezu parallel in ventral-posteriore und der VA3 Muskel (blau) in ventral-anteriore Richtung. V04 und VA3 erkennen dabei eine gemeinsame epidermale Anheftungsstellen. In homozygot defizienten *Df(2L)ED1231* Embryonen ist die Ausrichtung der V04-6 Muskel (grün) geringfügig verändert (C), während sich die VO4-6 (grün) und der VA3 Muskel (blau) in *Df(2L)ED1231, d-git^{Δa}* Doppelmutanten nahezu ventral orientieren und stark auf die ventrale Mittellinie zuwachsen (D). Die LT1-3 Muskeln (rot) verfehlen in der Defizienz nur vereinzelt ihre Anheftungsstelle (Pfeil, C), hingegen ignorieren die LT1-3 Muskel (rot) in *Df(2L)ED1231, d-git^{Δa}* ihre ventralen Anheftungsstellen nahezu komplett und zeigen enormes Wachstum in Richtung der Mittellinie (Pfeile, D).

3.5.8.3. Die Paxillin-Bindedomäne ist nicht für die Lokalisation von D-Git an die Muskelanheftungsstellen verantwortlich

Paxillin lokalisiert in Abhängigkeit von Integrinen an die Muskelanheftungsstellen (Tanentzapf & Brown, 2006), wo es wahrscheinlich als assoziierte Komponente an der Integrin-vermittelten Adhäsion zwischen Muskeln und epidermalen Anheftungsstellen beteiligt ist. In Vertebraten wird die Assoziation von Git mit fokalen Adhäsionsstrukturen über die Interaktion zwischen der Paxillin-Binde-Stelle (PBS) von Git und dem LD4 Motif von Paxillin vermittelt (Turner et al., 1999; Zhao et al., 2000; West et al., 2001; Matafora et al., 2001; Brown et al., 2002). Die PBS von *Drosophila* Git ist interessanterweise zu 34% mit der PBS von Vertebraten Git konserviert. Um herauszufinden, ob die PBS die Rekrutierung von D-Git an die Muskelanheftungsstellen vermittelt, wurde eine D-Git-Variante hergestellt, welchem die konservierte PBS fehlt. Nach Klonierung in den Transformationsvektor pUASt wurden transgene Fliegen mit Hilfe der P-Transposase (*UAS-d-gitΔPBS-FLAG*, Kap. 5.2.3., Abb. 36) generiert. Embryonen, die D-GitΔPBS-FLAG ektopisch im

Mesoderm überexprimieren, zeigten jedoch keine Defekte in der Muskulatur (Daten nicht gezeigt, Übersicht Abb. 36). Zudem lokalisierte D-Git auch nach Deletion der PBS ähnlich wie das vollständige D-Git Protein an den Muskelanheftungsstellen (Abb. 40A, D). Die PBS-Domäne von D-Git scheint somit nicht oder zumindest nicht alleine in der Rekrutierung von D-Git zu den Anheftungsstellen involviert zu sein.

Aus diesen Experimenten kann geschlussfolgert werden, dass D-Git zwar direkt mit Paxillin interagiert, diese Interaktion wahrscheinlich jedoch nicht für die Muskelentwicklung relevant ist.

3.5.9. Die ANK-Wiederholungen und die SH-Domäne werden für die Lokalisation von D-Git an die Muskelanheftungsstellen benötigt

Neben der katalytischen ArfGAP- und der PBS- Domäne besitzen Arf-GAPs der Git Familie weiterhin sogenannte Ankyrin-Wiederholungen (ANK) und die für Git Proteine charakteristische Spa2-Homologie-Domäne (SHD) (Abb. 25). Säuger Git Protein ist zudem in Arf6 vermitteltes Membran-Recycling und Endozytose involviert, wobei es zwischen der Plasmamembran und dem Recycling Endosomen zyklisiert (Matafora et al., 2001). Die Membranlokalisation von Git wird dabei durch die ANK-Wiederholungen vermittelt. In Säugern bildet Git zudem über die SHD-vermittelte Interaktion mit dem Austauschfaktor Pix einen Komplex mit der Pix-assoziierten Kinase Pak (Di Cesare et al, 2000). Die Anwesenheit und Relevanz eines D-Git/D-Pix/D-Pak-Komplexes während der Wegfindung der Muskeln in *Drosophila* konnte bereits in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Bahri et al. (2009) nachgewiesen werden. Die Deletion der SH-Domäne soll nun aufklären, ob die SH-Domäne auch in *Drosophila* für die Lokalisation des Komplexes verantwortlich ist.

Um zu analysieren, ob die ANK-Wiederholungen oder die SH-Domäne für eine Lokalisation von D-Git verantwortlich sind, wurden Deletionskonstrukte von D-Git hergestellt (UAS-*d-git*ΔANK-FLAG, UAS-*d-git*ΔSHD-FLAG, Abb. 36) und transgene Fliegen mittels P-Transposase vermittelter Integration etabliert (Kap. 5.2.3.). Expression von D-GitΔANK-FLAG im Mesoderm resultierte zwar nicht in Defekten in der Muskulatur, jedoch konnte festgestellt werden, dass D-GitΔANK-FLAG nicht mehr an den Anheftungsstellen akkumuliert, sondern im Zytoplasma der Muskeln vorliegt (Abb. 40B). Nur bei einer gesteigerter Expression des D-GitΔANK-FLAG durch Verwendung doppelter Kopie von UAS-Konstrukt und Gal4-Treiber (2x24B Gal4, 2x UAS-*d-git*ΔANK-FLAG) konnte eine Verkürzung des VA3 Muskels beobachtet werden (Abb. 40B). Die Überexpression im Mesoderm von D-GitΔANK-FLAG führt jedoch nicht zu Letalität, da stabile Linien etabliert werden konnten. Mesodermale Expression von D-GitΔSHD-FLAG hatte ebenfalls keine negativen Auswirkungen auf die Muskulatur (Abb. 36). Anti-FLAG Antikörperfärbungen haben jedoch gezeigt, dass D-GitΔSHD-FLAG nicht mehr an den Enden der Muskeln konzentriert, sondern zytoplasmatisch vorliegt (Abb. 40C).

Diese Daten zeigen, dass die Überexpression von D-Git Δ ANK-FLAG und D-Git Δ SHD-FLAG im Mesoderm keinen dominant-negativen Effekt auf die Entwicklung der Muskulatur auslöst. Aus diesen Experimenten kann aber auch geschlossen werden, dass sowohl die SH-Domäne als auch die ANK-Region für die Lokalisation von D-Git benötigt wird und damit in der Regulation und Funktionsweise von D-Git involviert sind.

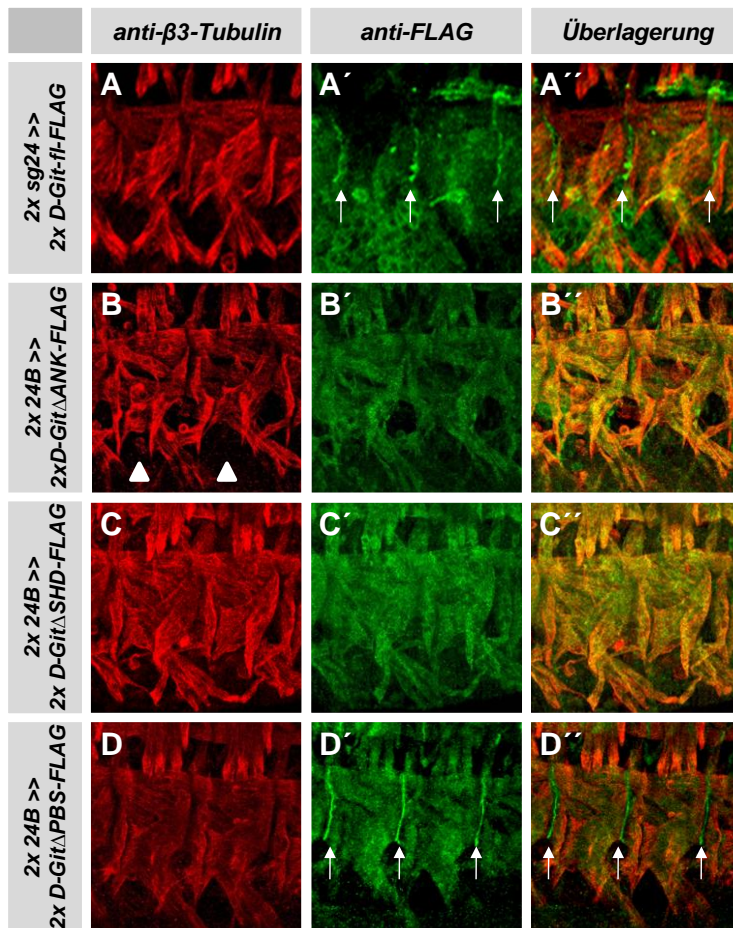


Abb. 40 Die ANK-Region und die SH-Domäne sind für die Anreicherung von D-Git an den Enden der Muskeln notwendig

β3-Tubulin (rot)- und anti-Flag (grün) Antikörperfärbungen zur Visualisierung der Muskeln, bzw. der ektopisch exprimierten D-Git Varianten. Gezeigt sind die ventralen Muskelgruppen von Stadium 16 Embryonen. Anterior ist links, dorsal ist oben.

Es handelt sich hierbei um Embryonen von stabilen Stämmen, die jeweils zwei Kopien der Gal4 Treiberlinie und des UAS-Konstruktes tragen. D-Git-fl-FLAG, und D-Git Δ PBS-FLAG lokalisierten an den Enden der Muskeln in der Nähe der Muskelanheftungs-Stellen (Pfeile in A und D), während D-Git Δ ANK-FLAG (B) und D-Git Δ SHD-FLAG (C) nur im Zytoplasma der Muskeln nachgewiesen werden konnten.

Ektopische exprimiertes D-Git Δ ANK-FLAG führt zu einem verkürzten und missgebildeten VA3-Muskel (B; Pfeilkopf).

3.5.10. D-Git zeigt eine intramolekulare Interaktion

In Säugern interagieren Git Proteine mit einer Anzahl von fokalen Adhäsions- und „aktive Zone“ assoziierten Proteinen, wie z. B. β-Pix, Fak oder Paxillin. Interessanterweise wird die gleichzeitige Bindung von Interaktionspartnern über die Bildung von Git-Homomultimeren ermöglicht (Kim et al., 2003). Homodimerisierung von Git Molekülen wird dabei über die sogenannte Coiled-Coil-Region, welche ein Leucin-Zipper-Motif enthält, vermittelt (Paris et al., 2003). Die Anwesenheit von Coiled-Coil Strukturen und charakteristischer Leucin-Reste in *Drosophila* Git konnte mit Hilfe des Multi-Coil Programmes (<http://groups.csail.mit.edu/multicoil>) bestimmt werden (Abb. 36). Intramolekulare Interaktion zwischen dem N- und dem C-Terminus von Git reguliert dabei zusätzlich über die Ausbildung einer inaktiven geschlossenen Konformation die Verfügbarkeit der funktionellen

Domänen (Totaro et al., 2007). Um einen ersten Einblick zu erlangen, ob die Funktion von D-Git auf ähnliche Weise reguliert werden könnte, sollte daher eine mögliche intramolekulare Interaktion von D-Git geprüft werden. Dazu wurden die in Kap. 3.5.7.3 beschriebenen Hefe-Konstrukte von D-Git (AD-D-Git-fl, DB_D-Git-fl, AD_D-Git-Gap, BD_D-GitGAP) verwendet, um eine direkte Interaktion zwischen D-Git Molekülen zu testen. Dabei konnte festgestellt werden, dass das kurze Gap-Fragment und das vollständige D-Git Protein in allen möglichen Kombinationen untereinander interagieren, jedoch nicht mit dem leeren Vektor (Abb. 41). Dies zeigt, dass auch das *Drosophila* Git in der Lage ist, eine intramolekulare Interaktion einzugehen und möglicherweise einer ähnlichen Regulation durch aktivierende Proteine wie z.B. durch Rac-GTP gebundenes Pak, unterliegen.

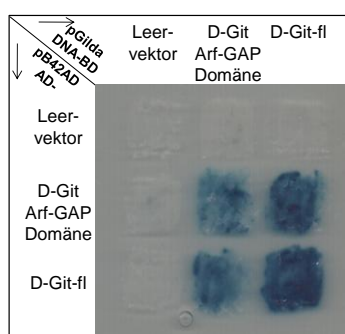


Abb. 41 Git zeigt eine intramolekulare Interaktion

Exemplarische Aufnahme des Interaktionstest zwischen D-Git-fl und D-Git-GAP. Gezeigt sind Kotransformanten nach drei Tagen Inkubation auf Galaktose und X-Gal-haltigen Induktionsplatten. Interaktion wird durch Wachstum und Blaufärbung angezeigt. D-Git-fl (D-Git-fl) bzw. die GAP-Domäne von D-Git (D-Git-GAP) wurden an DNA-Bindedomäne (pGilda) bzw. an die Aktivierungsdomäne (pB42AD) fusioniert. Interaktion konnte zwischen der GAP-Domäne von D-Git und D-Git-fl, sowie jeweils zwischen den GAP Domänen und zwischen Git-fl festgestellt werden, jedoch nicht in den Kontrollen mit den leeren Vektoren.

In diesem Abschnitt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass D-Git Protein zwar nicht in der Fusion der Myoblasten beteiligt ist, jedoch eine Rolle in der Wegfindung der Muskeln an ihre epidermalen Anheftungsstellen spielt. Genetische Interaktionsstudien deuten darauf hin, dass D-Git während der diesem Prozess als ein Arf-GAP für die D-Arf6 GTPase fungiert. Die im Hefe-Zwei-Hybrid-System beobachtete direkte Interaktion mit dem fokalen Adhäsionsprotein Paxillin deutete zunächst darauf hin, dass D-Git und seine assoziierten Proteine D-Pix und D-Pak über die Interaktion mit Paxillin an die Integrin-haltigen Muskelanheftungsstellen rekrutiert werden, genetische Interaktionsstudien zwischen *d-git* und *paxillin* konnten diese Vorstellung jedoch nicht bestätigen. Deletionskonstrukte konnten zudem zeigen, dass die Paxillin-Bindestelle von D-Git nicht für die Lokalisation von D-Git an die Muskelanheftungsstellen benötigt wird. Im Gegensatz dazu konnte eine essentielle Funktion der Ankyrin-Wiederholungen und der Spa-Homologie-Domäne von D-Git für die Lokalisation von D-Git demonstriert werden. Dieser Befund bildet damit die Grundlage für zukünftige Studien, um die Funktionsweise von D-Git in der Anheftung der Muskeln zu analysieren.

4. DISKUSSION

In *Drosophila* als auch in Vertebraten entstehen mehrkernige Muskeln durch die Fusion von Myoblasten. Zu den für die Myoblastenfusion essentiellen Faktoren gehört Schizo (auch Loner genannt; Chen et al., 2003). Schizo kodiert für einen Sec7-Domänen enthaltenden Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (GEF) der ADP-Ribosylierungsfaktoren (Arf) (Chen et al., 2003; Önel et al., 2004). Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit lag daher in der Identifikation der von Schizo aktivierten Arf-GTPase und deren funktionellen Analyse während der Myoblastenfusion. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bieten Hinweise, dass die Fusion der Myoblasten über die Aktivierung von D-Arf1 gefördert wird. Eine mögliche Rolle der D-Arf1-GTPase soll in den folgenden Kapiteln diskutiert werden. In den letzten Jahren konnte zudem die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts und deren Regulatoren für den Fusionsprozess vielfältig demonstriert werden. Eine Eingliederung von Schizo in die bekannten Signalkaskaden soll daher erörtert werden.

Neben aktivierenden Faktoren, welche den GDP/GTP-Austausch an Arf-GTPasen vermitteln, werden weiterhin inaktivierende Faktoren benötigt, welche die Hydrolyse des gebundenen GTPs katalysieren. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich daher mit der Identifizierung von Myogenese-relevanten Arf-GTPase-aktivierende Proteine (Arf-GAPs). Interessanterweise konnte das *Drosophila* Homolog des Vertebraten G protein-gekoppelter Rezeptor Kinase-interagierendes Protein (Git1/2; auch unter Cat, APP, oder p95-PKL bekannt), D-Git als im Mesoderm angereicherter Arf-GAP identifiziert werden. Die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von D-Git soll im zweiten Teil dieses Kapitels diskutiert werden.

4.1. Charakterisierung des *schizo* Allels *schizo*^{CI-28} – Schizo wird für die initiale Fusion von FCs und FCMs benötigt

Um die Funktion des Arf-GEFs Schizo zu analysieren, wurde in dieser Arbeit überwiegend mit dem *schizo* Allel *schizo*^{CI-28} gearbeitet, welches folgend mit den *schizo* Allelen *loner*^{T1032} und *loner*^{T1510} (Kap. 3.1.1) verglichen werden soll. In homozygoten *schizo*^{CI-28} mutanten Embryonen konnten keine Myoblasten oder Minimuskeln beobachtet werden, in denen eindeutig mehrere Kerne vorhanden sind (Kap. 3.1.4). Die Fusionseffizienz von *schizo*^{CI-28} mutanten Embryonen wurde zudem durch Auszählung der Kerne des dorsalen Muskels DA1 bestimmt, der im Wildtyp 14 Kerne besitzt. Auch hier konnten nur einkernige Muskeln beobachtet werden (S. Önel; V. Groth). Dies bedeutet, dass die Fusion der Myoblasten in *schizo*^{CI-28} mutanten Embryonen vollständig unterbrochen ist. Im Gegensatz dazu konnten in *loner*^{T1032} Mutanten gelegentliche Fusionsereignisse beobachtet werden (Chen et al., 2003; Beckett & Baylies, 2007; Bulchand et al., 2010). Beckett & Baylies (2007) zählten eine durchschnittliche Anzahl von 1,4±0,73 Kernen, während Bulchand et al. (2010) eine durchschnittliche Anzahl von 2,11±0,91 Kernen im DA1 Muskeln beobachtet haben. Obwohl die Kernzählungen aller

Allele parallel unter den gleichen experimentiellen Bedingungen wiederholt werden sollten, deuten diese Daten darauf hin, dass die Fusion der Myoblasten in *schizo*^{CI-28} Mutanten stärker beeinflusst ist als in *loner*^{T1032} Mutanten. Zudem zeigen *schizo*^{CI-28} Mutanten wie die genomische Defizienz für *schizo* einen Defekt im Nervensystem in der Ausbildung der Kommissuren, während *loner*^{T1032} und *loner*^{T1510} keinen Kommissuren-Phänotyp zeigen (S. Önel). Die phänotypische Charakterisierung der verschiedenen *schizo* Allele weist somit darauf hin, dass es sich bei *schizo*^{CI-28} im Vergleich zu *loner*^{T1032} und *loner*^{T1510} um ein stärkeres Allel handelt. Es stellt sich die Frage, wie diese Beobachtungen auf molekularem Level erklärt werden können. Die Allele *loner*^{T1032} und *loner*^{T1510} weisen direkt benachbart ein vorzeitiges Stopkodon im dritten Exon auf, welches zu einem verkürzten Schizo-Protein und dem gleichzeitigen Verlust der katalytischen Sec7- und der PH-Domäne führt (Chen et al., 2003). Möglicherweise ist das verkürzte Schizo-Fragment in der Lage, gelegentliche Fusionsereignisse einzuleiten und ausreichend, um die Funktion von Schizo während der Ausbildung der Kommissuren zu übernehmen. Dies würde ferner implizieren, dass die Sec7- und die PH-Domäne nicht für die Entwicklung des Nervensystems benötigt werden und Schizo im zentralen Nervensystem über die weiter N-terminal gelegene IQ-Domäne wirkt. IQ-Domänen können das Ca²⁺-Sensor-Protein Calmodulin binden (Rhoads & Friedberg, 1997). Eine Rolle von Calmodulin in der Ausbildung der Kommissuren konnte bereits belegt werden (Fritz & VanBerkum, 2000). Die Vermutung, dass das verkürzte Protein die Funktion in dem ZNS vermitteln kann, könnte durch Rettungsexperimente untersucht werden. Ein verkürztes Schizo Protein, welches der Größe des translatierten Schizo-Proteins in den *loner*-Allelen entspricht, sollte dann in der Lage sein, den ZNS-Defekt von *schizo*^{CI-28} Mutanten oder einer *schizo*-Defizienz zu retten.

Aufgrund der phänotypischen Analyse sollte es sich bei *schizo*^{CI-28} hingegen um einen kompletten Funktionsverlust von Schizo handeln. Die molekulare Mutation für das Allel *schizo*^{CI-28} konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden. Es sind keine spezifische Basenaustausche vorhanden, welche zu einem verkürztem oder verändertem Protein bzw. Spleiß-Defekte führen (Kap. 3.1.2). Zudem scheint die Transkription der *schizo* mRNA nicht negativ beeinflusst zu sein (Kap. 3.1.3). Diese Daten deuten möglicherweise auf einen Defekt in der Translationsregulation hin. Ein Überschuss an Schizo Protein kann nicht die Ursache für den mutanten Phänotyp sein, da zumindest die mesodermale Überexpression von Schizo keinen Fusionsdefekt induziert (Daten nicht gezeigt). Um zu klären, ob möglicherweise die Translation in *schizo*^{CI-28} inhibiert ist und kein Schizo Protein synthetisiert wird, ist ein Schizo-Antikörper notwendig. Jedoch konnte bisher auch nach verschiedenen Methoden kein funktionierender Schizo-Antikörper generiert werden.

4.2. Schizo agiert als unkonventioneller GEF für D-Arf1

Schizo kodiert für einen Sec7-Domänen beinhaltenden Austauschfaktor für kleine GTPasen der Arf-Familie (Chen et al., 2003; Önel et al., 2004). Aufgrund seiner Domänenstruktur repräsentiert Schizo das *Drosophila* Homolog der BRAG Unterfamilie der Arf-GEFs, welche spezifisch den GDP/GTP-Austausch an Arf6 katalysieren (Someya et al., 2001; Dunphy et al., 2006; Hiroi et al., 2006). Studien an Maus C2C12 Myoblasten haben zudem gezeigt, dass BRAG2 während der Fusion der Myoblasten in der Aktivierung der Arf6-GTPase involviert ist (Pajcini et al., 2008), so wie es auch für *Drosophila* postuliert wurde (Chen et al., 2003). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente unterstützen jedoch nicht die Vorstellung, dass Schizo während der Myoblastenfusion in der Regulation der D-Arf6-GTPase funktioniert. Erstens war die mesodermale Einführung eines konstitutiv-aktiven, GTP-gebundenen D-Arf6 nicht in der Lage, den Fusionsphänotyp von *schizo* mutanten Embryonen zu retten. Somit scheint Schizo zumindest nicht ausschließlich in der Aktivierung der D-Arf6-GTPase involviert zu sein. Zweitens konnte weder die Überexpression eines konstitutiv-aktiven, GTP-gebundenen D-Arf6 noch die Überexpression eines inaktiven, GDP-gebundenen D-Arf6 einen Defekt in der Myoblastenfusion bzw. Letalität hervorrufen (Kap. 3.3.2.1). Diese Daten stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Dyer et al. (2007), die zeigen, dass der Verlust von D-Arf6 keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Tiere hat. Drittens konnte weder eine genetische Interaktion von Schizo und D-Arf6 während der Myoblastenfusion noch eine direkte Interaktion im Hefe-Zwei-Hybridsystem festgestellt werden (Kap. 3.3.5). Aus diesen Daten kann geschlussfolgert werden, dass D-Arf6 zumindest nicht das einzigste Ziel des Arf-GEFs Schizo sein kann und Schizo die Myoblastenfusion möglicherweise über die weiteren in *Drosophila* existierenden Arf-GTPasen D-Arf1 oder D-Arf2 reguliert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Rettungsexperimente mit einer konstitutiv-aktiven, GTP-gebundenen Form von D-Arf1 indizieren, dass Schizo die Myoblastenfusion durch die Aktivierung der D-Arf1 GTPase vermittelt (Kap. 3.3.2.3). Diese Vermutung wird zudem durch die Hefe-Zwei-Hybrid-Daten unterstützt, in denen Schizo spezifisch mit der GDP-gebundenen Form von D-Arf1 interagiert (Kap. 3.3.5). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Schizo im Gegensatz zu seinen Vertebraten Homologen der BRAG-Unterfamilie der Arf-GEFs in der Aktivierung eines Klasse I Arf Proteins fungiert und damit einen für Arf-GEFs der BRAG-Unterfamilie unkonventionellen Mechanismus darstellt.

Allerdings führt die mesodermale Expression von GDP-gebundenen, inaktiven D-Arf1 nicht zu einem Fusionsdefekt und Mutanten für *d-arf1* sind nicht letal (diese Arbeit; Parks et al., 2004) und zeigen demzufolge auch keinen Fusionsdefekt (Kap. 3.3.3). Eine mögliche Erklärung liefert maternal bereitgestelltes *d-arf1*, welches in *d-arf1* Mutanten auch in fusionsrelevanten Stadien nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.3.3.3). Die Eliminierung dieser maternalen Komponente konnte jedoch nicht experimentiell durchgeführt werden, da die Induktion von maternal und zygotischen *d-arf1* Mutanten über Keimbahnklone nicht möglich ist. Alternativ zu Keimbahnklonen könnte versucht werden, die maternal bereitgestellte mRNA durch die ubiquitäre Expression von gegen *d-arf1* gerichteten RNAi-

oder dominanten-negativen Konstrukten im *d-arf1* zygotisch mutanten Hintergrund abzufangen. Neben der maternalen Komponente von *d-arf1* existiert weiterhin die Möglichkeit, dass funktionelle Redundanzen der Grund für das Fehlen eines Phänotyps ist. Beispielsweise agieren die Transmembran-Rezeptoren Duf und Rst (Ruiz-Gomez et al., 2000; Strünkelnberg et al., 2001) oder die Rac GTPasen (Hakeda-Suzuki et al., 2002) während der Myoblastenfusion in funktionieller Redundanz. Die *Drosophila* Arf-GTPasen, *d-arf1*, *d-arf2* und *d-arf6*, zeigen ähnlich wie die Rac-GTPasen eine ubiquitäre Transkription während der gesamten Embryonalentwicklung (Kap. 3.3.1). Dies könnte daraufhindeuten, dass auch die Arf-GTPasen redundant wirken und in den Einzelmутanten in der Lage sind, sich gegenseitig zu ersetzen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine redundante Funktion zwischen D-Arf1 und D-Arf6 ausgeschlossen werden (Kap. 3.3.4.3). Die Behauptung, dass D-Arf1 und D-Arf6 sich nicht gegenseitig ersetzen können, wird zudem durch die Lokalisationsexperimente in den COS-Zellen (Kap. 3.3.6) und *Drosophila* S2-Zellen (Daten nicht gezeigt), sowie durch bekannte Funktionen der Vertebraten Homologe der Arf-GTPasen unterstützt. Während Arf1 überwiegend am Golgi lokalisiert und in der Generierung von Transportvesikeln involviert ist, fungiert Arf6 vornehmlich in der Umorganisation des kortikalen Aktin-Zytoskelettes und endozytotischen Vorgängen an der Plasmamembran (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). Damit steht Klasse I Arf1 sowohl in der Lokalisation als auch in der Funktion in starken Kontrast zu Arf6 als Repräsentant der Klasse III. Im Gegensatz dazu zeigen Klasse II Arf-GTPasen eine zu Klasse I Arf-GTPasen vergleichbare Expression am Golgi, wo sie überlappende und partiell redundante Funktionen erfüllen (Balch et al., 1992; Liang & Kornfeld, 1997; Volpicelli-Dalley et al., 2005). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Klasse I und II Vertreter Arf1 und Arf2 in *Saccharomyces cerevisiae* funktionell austauschbar sind, da nur die gleichzeitige Deletion von Arf1 und Arf2 zu Letalität der Hefezellen führt, während die einzelnen Deletionen keinen Einfluss auf die Vitalität der Hefezellen hat (Gaynor et al., 1998). Vorläufige Resultate aus den Lokalisationsstudien in S2-Zellen haben zudem gezeigt, dass auch *Drosophila* D-Arf1 und D-Arf2, beide perinukleär lokalisiert sind (Daten nicht gezeigt) und somit eine funktionelle Redundanz zwischen D-Arf1 und D-Arf2 vorstellbar ist. Aufgrunddessen, dass sich das *d-arf2* Gen auf dem vierten Chromosom befindet, welches zu dem Zeitpunkt dieser Arbeit kreuzungsgenetisch noch nicht zugänglich ist, ist es jedoch nicht möglich, Mutanten für *d-arf2* zu analysieren und eine Redundanz zwischen D-Arf1 und D-Arf2 mittels einer Doppelmutantenanalyse aufzuklären. Daher sollte eine mögliche Redundanz zwischen D-Arf1 und D-Arf2 durch die mesodermale Koexpression von GDP-gebundenem, inaktiven D-Arf1 und D-Arf2 oder durch die Verwendung von RNAi Konstrukten überprüft werden. In diesen Embryonen müsste ein Fusionsdefekt zu erwarten sein. Um weiterhin zu analysieren, ob Schizo *in vivo* in der Aktivierung der D-Arf2-GTPase involviert ist, ist es zudem notwendig, die Rettungsexperimente mit der GTP-gebundenen Form von D-Arf2 auszuführen. Sollten D-Arf1 und D-Arf2 überlappende Funktionen während der Myoblastenfusion übernehmen, ist zumindest eine partielle Rettung des *schizo* mutanten Myoblastenfusionsdefekt zu erwarten.

4.2.1. Einfluss der Sec7-Domäne auf die Substratspezifität

Obwohl die *in vitro* Substratspezifität für viele Arf-GEF Proteine bestimmt wurde, ist es jedoch nicht bekannt, wie die Präferenz für eine bestimmte Arf-GTPase *in vivo* gewährleistet wird. Eine wichtige Frage ist, ob die Sec7-Domäne selber in der Substratspezifität involviert ist oder flankierende Sequenzen beteiligt sind. Multiple Sequenzvergleiche der Sec7-Domäne von Arf-GEFs verschiedener Unterfamilien und Organismen haben ergeben, dass zwar eine Diversität zwischen den einzelnen Unterfamilien existiert und es konservierte, in der Bindung der Arf-GTPase essentielle Aminosäuren gibt, jedoch können diese nicht alleine die Substratspezifität für eine bestimmte Klasse der Arf-GTPasen erklären (Cox et al., 2004). Ein Kriterium der Sec7-GEFs, welches direkt über die Sec7-Domäne spezifiziert wird, ist die Resistenz gegenüber Brefeldin A (BFA). BFA ist ein aus Pilzen abstammendes Metabolit, welches als nicht-kompetitiver Inhibitor über die gleichzeitige Bindung an die Sec7-Domäne und die Arf-GTPase den intermediären Arf-GDP-Sec7-Komplex stabilisiert und somit den GDP/GTP-Austausch verhindert (Sata et al., 1998; Peyroche et al., 1999; Robineau et al., 2000). Grundsätzlich gesehen sind die niedriger-molekulargewichtigen Arf-GEFs, wie z. B. der Cytohesin, EFA oder BRAG Unterfamilie, resistent gegenüber BFA, während die hoch-molekulargewichtigen Arf-GEFs der BIG oder GEA/GBF-Unterfamilie BFA-sensitiv sind (Review: Jackson & Casanova, 2000; Casanova, 2007). Auf der Basis von Mutantenanalysen und Sequenzvergleichen konnten essentielle Aminosäurereste identifiziert werden, welche der Sec7-Domäne Sensitivität gegenüber BFA verleihen (Cox et al., 2004; Zeeh et al., 2005). Interessanterweise wird für Schizo auf der Basis der kritischen Aminosäuren im Gegensatz zu seinen humanen homologen Proteinen BRAG1-3 BFA-Sensitivität suggeriert (Cox et al., 2004). Obwohl der Einfluss von BFA auf Schizo noch experimentiell geklärt werden muss, unterstützen diese *in silico*-Analysen die Vermutung, dass die katalytische Aktivität von Schizo von den humanen Homologen der BRAG Unterfamilie der Arf-GEFs abweicht. Eine Inhibition des GDP/GTP-Austausches durch BFA-Behandlung konnte zudem ausschließlich für Arf-GTPasen der Klasse I oder II demonstriert werden, jedoch nicht für Arf6 als Vertreter der Klasse III (Zeeh et al., 2005). Dies könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass Schizo im Falle einer BFA-Sensitivität in der Aktivierung von Klasse I oder Klasse II Arf-GTPasen fungiert.

4.2.2. Einfluss der benachbarten PH-Domäne auf Substratspezifität

Neben der Sec7-Domäne zeichnen sich Arf-GEF Proteine durch weitere, innerhalb ihrer Untergruppen konservierten Domänen aus. Diese Domänen können die Substratspezifität für eine bestimmte Arf-GTPase regulieren, in dem sie die Lokalisation des Arf-GEFs determinieren oder upstream Signale vermitteln, welche die katalytische Aktivität des Arf-GEFs anregen. Eine Domäne, welche in mehreren Arf-GEFs vorhanden ist und sich in direkter Nachbarschaft zu der katalytischen Sec7-Domäne befindet, ist die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne; Gillingham & Munro, 2007). PH-Domänen binden an negativ geladene Inositol-Phosphate (PI) in speziellen Membransubdomänen (Lemmon, 2008), so dass die Substratspezifität für eine bestimmte Arf-GTPase möglicherweise durch

die Membranlokalisation des Arf-GEFs reguliert wird. So konnten Derrien et al. (2002) beispielsweise zeigen, dass die PH-Domäne des Arf6 Austauschfaktors EFA6 über die Interaktion mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PI4,5P₂) die Kolokalisation mit Arf6 an Aktin-reiche Membranfortsätzen vermittelt. Die PH-Domänen selber weisen jedoch ein breites Spektrum an Bindungsaffinität und -spezifität für bestimmte PI auf (Lemmon & Ferguson, 2000). So ist z. B. die PH-Domäne von OSBP ausreichend, um eine Translokation des Proteines an Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P)-reiche Membranabschnitte des Golgis zu vermitteln (Levin & Munro, 2002). Daher ist es notwendig, die Funktion jeder PH-Domäne individuell zu ermitteln. Die Relevanz der PH-Domäne von Schizo für die Myoblastenfusion in *Drosophila* konnte bereits durch Rettungsexperimente demonstriert werden (Chen et al., 2003), jedoch ist die präzise Funktion dieser Domäne noch ungelöst. Um einen ersten Einblick zu bekommen, ob die PH-Domäne von Schizo in der Membranlokalisation involviert ist, wurde bereits ein Schizo-PH-Domänen-GFP Fusionsprotein hergestellt (Daten nicht gezeigt). Zukünftige Überexpressions- und Kolokalisationsanalysen in *Drosophila* Zellen und Embryonen werden zeigen, ob die PH-Domäne von Schizo an distinkte Membranabschnitte lokalisiert und ein übereinstimmendes Expressionsmuster mit einem der Arf-GTPasen zeigt.

Obwohl die meisten PH-Domänen eine basale Affinität für PI aufweisen, ist einschränkend zu bemerken, dass nur ca. 10 % der PH-Domänen spezifisch an PI binden (Lemmon, 2008). Die PH-Domänen der Arf-GEFs der BRAG-Unterfamilie, zu denen auch Schizo gehört, zeigen zudem nur eine sehr geringe Sequenzübereinstimmung zu den PIP₂-spezifischen PH-Domänen der Arf-GEFs der Cytohesin oder EFA6 Unterfamilien (Someya et al., 2001). In Übereinstimmung dessen konnte kürzlich dargestellt werden, dass das Sec7-PH-Domänen-Modul von BRAG2 mit den Tyrosin-phosphorylierten, intrazellulären Domänen des EGF-Rezeptors (Morishige et al., 2008) sowie des AMPA-Glutamaterezeptors (Scholz et al., 2010) interagiert. Dies könnte wiederum daraufhindeuten, dass die PH-Domänen der Arf-GEFs der BRAG-Unterfamilie in der Erkennung von intrazellulären Domänen von Rezeptoren und nicht von PI involviert sind. Unter dieser Annahme könnte das Schizo-PH-GFP Fusionsprotein möglicherweise mit den Adhäsionsrezeptoren Duf, Rst, Hbs oder Sns kolokalisieren. Diese Experimente lassen jedoch keine Aussage über die Substratspezifität für eine bestimmte Arf-GTPase zu.

4.2.3. Möglichkeiten, um die Funktion von D-Arf1 in der Myoblastenfusion *in vivo* zu verifizieren

Weiterhin ist es dringend notwendig, die Relevanz der D-Arf1-GTPase für die Myoblastenfusion *in vivo* zu verifizieren. Genetische Interaktionsstudien zwischen *schizo* und *d-arf1* sind aufgrund der genetischen Situation nicht möglich (Kap. 3.3.4.1). Alternativ können Fluoreszenz-basierte Methoden angewandt werden. Dies könnte zum Beispiel durch die mesodermale Überexpression von Fluoreszenz-markierten Schizo sowie der Arf-GTPasen und anschließende Kolokalisationsstudien

erfolgen. Um zudem eine Interaktion zwischen Schizo und D-Arf1 zu bestätigen, sollte die Methode der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) angewandt werden. BiFC beruht auf der Wiederherstellung der Fluoreszenz nach Komplementation zweier Nicht-Fluoreszierender Fragmente, welche durch Interaktion von den zu analysierenden Proteinen in direkte Nähe gebracht werden (Ciruela, 2008). Da kürzlich demonstriert werden konnte, dass BiFC auch im *Drosophila* Embryo funktioniert (Vortrag Hudry B, EDRC 2009), bietet diese Methode eine gute Möglichkeit, um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen und gleichzeitig die intrazelluläre Lokalisation der zu interagierenden Proteine zu bestimmen. Eine andere Möglichkeit, um eine Aktivierung von D-Arf1 in den Myoblasten zu visualisieren, ist der Gebrauch der Arf1-bindenden Domäne von ARHGAP10 (ABD), welche als spezifischer Sensor für GTP-gebundenes Arf1 in Zellen fungiert (Kumari & Mayor, 2008). Nach Koexpression in *Drosophila* Zellen oder im Mesoderm von *Drosophila* Embryonen sollten zum Beispiel GFP-Schizo mit RFP-ABD positiven Strukturen assoziieren. Weiterhin sollte die Lokalisation von RFP-ABD positiven Strukturen in *schizo* Mutanten verändert oder abwesend sein.

4.2.4. Überexpression von GTP-gebundenem D-Arf1 resultiert in Defekten in der Muskulatur

Im Gegensatz zu dem Verlust der D-Arf1-Aktivität resultiert die mesodermale Überexpression einer dominant-aktiven, GTP-gebundenen Form von D-Arf1 zu Defekten in der Myoblastenfusion. Es handelt sich hierbei um einen partiellen Fusionsdefekt, da neben unfusionierten Myoblasten vor allem in dem ventralen Bereich auch mehrkernige Myotuben zu beobachten waren (Kap. 3.3.2.4). Des weiteren führt besonders die frühe mesodermale Expression von GTP-gebundenem D-Arf1 zu einer im Vergleich zu typischen Fusionsmutanten veränderten morphologischen Gestalt der Embryonen, die generelle Probleme in der Entwicklung des Mesoderms vermuten lassen. Ein Defekt in der Spezifikation von FCs und FCMs konnte jedoch ausgeschlossen werden (Kap. 3.3.2.5). Die spezifische Relevanz des Überschuss an aktiviertem D-Arf1 für die Myoblastenfusion ist ungeklärt. Es kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass die Überexpression von GTP-gebundenem D-Arf1 mit anderen Signalwegen interferiert, die gewöhnlicherweise keinen Einfluss auf die Myoblastenfusion haben. Die Überexpression von dominant-aktiven, GTP-gebundenem Arf1 in HeLa-Zellen inhibiert den *intra*-Golgi-Transport und resultiert in der Akkumulation von COPI-umhüllten Vesikeln an den Golgi-Intermediaten (Dascher & Balch, 1994). Daher besteht die Möglichkeit, dass die Überexpression von konstitutiv-aktiven D-Arf1 im Mesoderm generell mit dem *intra*-Golgi Vesikeltransport und mit der Neusynthese von Proteinen interferiert. Andererseits ist es möglich, dass die konstitutiv-aktive Form von D-Arf1 spezifische Effektoren abfängt und daher einen Fusionsdefekt zeigt. Dies könnte nach der Aufklärung der Wirkungsweise von D-Arf1 während der Myogenese analysiert werden oder sogar benutzt werden, um über einen Effektorscreen neue Komponenten des Signalweges aufzudecken.

4.3. Die mögliche Rolle von Schizo in der Myoblastenfusion

4.3.1. Schizo ist nicht in der lokalen F-Aktin Regulation involviert

Die Fusion der Myoblasten wird sowohl in *Drosophila* (Kesper et al., 2007; Richardson et al., 2007; Kim et al., 2007; Massarwa et al., 2007) als auch in Vertebraten (Nowak et al., 2009) durch eine lokale Anreicherung von F-Aktin an den Kontaktstellen der Myoblasten begleitet (siehe Einleitung). Die Arp2/3 vermittelte F-Aktin-Bildung wird dabei durch ein koordiniertes Zusammenspiel der beiden Nukleations-fördernden Faktoren Wasp und Scar vermittelt. Seit geraumer Zeit wird postuliert, dass die Aktivität von Scar durch die GTPase Rac reguliert wird. Jedoch gab es lange Zeit keine experimentiellen *in vivo* Daten, welche eine Verbindung zwischen Rac und Scar beweisen (siehe auch Diskussion in Rochlin et al., 2009, Haralalka & Abmayr, 2010). Die in dieser Arbeit durchgeführte Doppelmутantenanalyse konnte nun belegen, dass die Rac1 GTPase während der Myoblastenfusion mit Scar kooperiert (Kap. 3.4.4), so wie es bereits in einer Vielzahl von Studien in anderen Geweben belegt werden konnte (Eden et al., 2002; Steffen et al., 2004; Patel et al., 2008). Der Signalweg, welcher die erfolgreiche Erkennung und Adhäsion zwischen den Myoblasten mit der Aktivierung der Rac-GTPase verbindet, ist jedoch nicht genau geklärt.

Chen et al. (2003) haben postuliert, dass Schizo auf den Seiten der FCs in der Lokalisation der Rac-GTPase an die Membran fungiert, vermutlich über die Regulation der D-Arf6 GTPase. Basierend auf Studien an Säuger-Zellen existieren verschiedene Modelle, wie Arf6 die Translokation der RacGTPase kontrolliert (Myers & Casanova, 2008). Einerseits wird angenommen, dass Arf6 die Umverteilung von endosomal-lokalisiertem Rac an die Plasmamembran reguliert (Radhakrishna et al., 1999; Boshans et al., 2000). Andererseits besteht die Vorstellung, dass Arf6 die Aktivität von Rac über die Bereitstellung von cholesterol-reichen Microdomänen an der Plasmembran moduliert, in welche prenyliertes Rac passiv eingelagert wird (Del Pozo et al., 2002; Balasubramanian et al., 2007). Während der Myoblastenfusion scheint die Translokation von Rac jedenfalls nicht über die Schizo katalysierte D-Arf6 Aktivierung zu erfolgen. Erstens zeigen maternal und zygotische *d-arf6* Mutanten keinen Fusionsdefekt (Dyer et al., 2007), was gegen eine Funktion von D-Arf6 spricht. Zudem kann die Überexpression von GTP-gebundenem, aktiven D-Arf6 nicht den *schizo* Fusionsdefekt retten (Kap. 3.3.2.2). Zweitens können die in dieser Arbeit durchgeführten Doppelmутantenanalysen keine genetische Interaktion zwischen *schizo* und *rac1* feststellen (Kap. 3.4.1) und ein Überschuss an wildtypischen bzw. konstitutiv-aktivierten Rac1 ist nicht in der Lage, den Fusionsdefekt von *schizo* mutanten Embryonen zu retten (Kap. 3.4.2).

Im Gegensatz zu Chen et al. (2003) haben Richardson et al. (2007) berichtet, dass Rac auch in wildtypischen Embryonen punktuell in dem Zytoplasma der Myoblasten vorliegt und nur eine partielle Überlappung mit der lokalen F-Aktin Anreicherung an der Kontaktstelle der Myoblasten zeigt. Daher ist anzunehmen, dass die lokale Aktivierung der Rac induzierten F-Aktin-Bildung nicht über die Lokalisation der Rac-GTPase selber, sondern über die Lokalisation des Austauschfaktors für

Rac reguliert wird. Der GDP/GTP-Austausch an Rac wird während der Myoblastenfusion durch den unkonventionellen Austauschfaktor Mbc vermittelt, welcher in Kooperation mit *Drosophila* Elmo agiert (Erickson et al., 1997; Nolan et al., 1998; Geisbrecht et al., 2007). Die homologen Proteine von Mbc und *Drosophila* Elmo, Dock180 und Säuger Elmo, werden in Epithelzellen durch den Sec7-Austauschfaktor ARNO über die Aktivierung der Arf6-GTPase an die Plasmamembran rekrutiert, wo sie folgend in der Aktivierung der Rac-GTPase involviert sind (Santy et al., 2005). Es wäre daher denkbar, dass Schizo eine zu ARNO vergleichbare Funktion während der Myoblastenfusion übernimmt und die Lokalisation des Mbc/D-Elmo-Komplexes reguliert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen weisen jedoch nicht darauf hin, dass Schizo, D-Arf6 und Rac während der Myoblastenfusion zusammenspielen. Zudem konnte die Überexpression von konstitutiv-aktiven Rac1 in den FCMs eine partielle Rettung des Fusionsphänotyp von *mbc* mutanten Embryonen erreichen (Pers. Kommunikation, S. Abmayr), während die FCM-spezifische Expression von konstitutiv-aktiven Rac1 zu keiner Verbesserung des *schizo* mutanten Fusionsphänotyp führt (Kap. 3.4.2). Somit weisen die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht darauf hin, dass Schizo in dem Mbc/Elmo -> Rac Signalweg konvergiert. Diese Ergebnisse werden zudem durch immunhistologische Untersuchungen bestätigt, die zeigen, dass Mbc, aber nicht Schizo mit dem Aktin-Spot an der Kontaktstelle der Myoblasten kolokalisiert (Richardson et al., 2007). Die Lokalisation von Mbc hängt darüber hinaus nicht von Schizo ab, da Mbc in *schizo* Mutanten korrekt lokalisiert (Richardson et al., 2007). Die Annahme, dass die Austauschfaktoren Schizo und Mbc in unterschiedlichen Signalwegen wirken, wird weiterhin durch Untersuchungen an murinen C2C12 Myoblasten unterstützt, in denen gezeigt werden konnte, dass die Deletion der homologen Proteine von Schizo und Mbc, BRAG2, bzw. Dock180 in unterschiedlichen morphologischen Phänotypen resultiert (Pacjini et al., 2008). Zusammenfassend legen diese Daten die Vermutung nahe, dass Mbc/Dock180 in Myoblasten anders als in Epithelzellen nicht über einen Sec7-GEF an die Membran rekrutiert wird, sondern einen distinkten Mechanismus benötigt, um an die Fusionsstelle transportiert zu werden.

Weitere Interaktionsstudien mit den Aktin-Regulatoren Scar und Wasp konnten ebenfalls keinen funktionellen Zusammenhang zwischen Schizo und der F-Aktin Bildung aufdecken (Kap. 3.4.2; 3.4.7). Diese Daten stehen im Einklang mit der Tatsache, dass *schizo* Mutanten Aktin-Anreicherungen mit einer dem Wildtyp entsprechenden Größe aufweisen, während die Aktin-Anreicherung in Mutanten von *rac* oder *scar* Einzelmutanten, sowie in Mutanten für anderen Aktinregulatoren vergrößert ist (Richardson et al., 2007).

Zusammenfassend kann daher postuliert werden, dass Schizo zumindest nicht direkt in der F-Aktin-Polymerisierung an der Fusionsstelle involviert ist. Somit scheint Schizo die Fusion durch einen distinkten, von F-Aktin-unabhängigen Mechanismus zu regulieren, wie z.B. der posttranskriptionellen Regulation von fusions-relevanten Proteinen oder der Beeinflussung der Lipidzusammensetzung der Membran. Diese Möglichkeiten sollen in den folgenden Kapiteln 4.3.2 und 4.3.3 diskutiert werden. Die Tatsache, dass *schizo* Mutanten durch einem im Vergleich zu anderen Fusionsmutanten sehr drastischen Fusionsdefekt charakterisiert sind, zeigt, dass es sich hier um eine essentielle und sehr grundlegende Funktion von Schizo in dem Fusionsprozess handeln muss.

4.3.2. Schizo könnte die Fusion durch die Bereitstellung von speziellen Phospholipiden fördern

Kürzlich konnten Nowak et al. (2009) und Bach et al. (2010) zeigen, dass die Fusion von Maus C2C12 Myoblasten durch die lokale Aktivierung von Phospholipase D (PLD) und der Synthese von PI4,5P₂ begleitet wird. Auch in *Drosophila* konnte die Anwesenheit von PI4,5P₂ an der Peripherie des Aktin-Fokus an den Kontaktstellen zwischen FC und FCM bzw. wachsender Muskel und FCM demonstriert werden (Bothe & Baylies, ADRC 2010). PI4,5P₂ fungiert über die Bindung an sogenannte Phospho-Inositid erkennende Domänen, wie z.B. die PH-Domäne, in der Rekrutierung und Aktivierung vieler regulatorischer Proteine (Takenawa & Itoh, 2001; Roth, 2004). Es kann daher postuliert werden, dass lokal bereitgestelltes PI4,5P₂ in der Rekrutierung von fusionsrelevanten Proteinen an die Fusionsstelle fungiert. Interessanterweise regulieren Arf-GTPasen den intrazellulären Vesikeltransport durch die Stimulation von Enzymen, welche die Bildung von verschiedenen Phospholipiden katalysieren. Ähnlich wie Arf6 bindet und aktiviert GTP-gebundenes Arf1 die PI4P5-Kinase und PLD, welche in der Produktion von PI4,5P₂ bzw. Phosphatidic Acid (PA) fungieren (Brown et al., 1993; Cockcroft et al., 1994; Jones et al., 2000; Skippen et al., 2002). Es stellt sich daher die Frage, ob Schizo die Fusion über die lokale Synthese von PI4,5P₂ reguliert. Unter dieser Annahme sollte in *schizo* Mutanten kein PIP₂ nachzuweisen sein.

Die Fusion der Myoblasten benötigt nicht nur einen Mechanismus, welcher die gegenseitige Erkennung und Adhäsion zwischen FCs und FCMs bzw. wachsende Muskeln und FCMs vermittelt, sondern verlangt vielmehr einen Mechanismus, welcher die Auflösung der aneinandergelagerten Membranen einleitet, um eine zytoplasmatische Kontinuität zwischen den Myoblasten zu gewährleisten. In ultrastrukturellen Untersuchungen von Doberstein et al. (1997) konnten einige Membran-assoziierte Strukturen identifiziert werden, die vermutlich kurz vor der Vesikulierung der Membran an der Stelle der zukünftigen Fusionspore auftreten. Zu diesen Strukturen gehören paarig auftretende elektronen-dichte Vesikel (40 nm im Durchmesser), die in ihrer Gesamtheit den sogenannten Präfusionskomplex bilden, sowie elektronen-dichte Plaques (ca. 500 nm), die häufig in der Nähe der Membranvesikulierung beobachtet werden konnten. Weder die genaue Zusammensetzung und Funktion dieser elektronen-dichten Vesikel, noch die Beziehung zwischen

elektronen-dichten Vesikeln und Plaques ist bisher gelöst. Interessanterweise können auch elektronen-dichte Vesikel bei der Bildung der exozytotischen Fusionspore in sekretorischen Zellen beobachtet werden (Bader & Vitale, 2009). Dabei wurde postuliert, dass das Hemifusionsstadium zwischen den angelagerten Vesikeln und der Plasmamembran, welches der exozytotischen Fusionspore vorausgeht, durch lokal bereitgestelltes PA gefördert wird. PA unterstützt aufgrund seiner kegelförmigen Gestalt die Bildung von negativen Membrankrümmungen, welche sowohl bei der Abschnürung von Vesikeln als auch bei der Bildung des Hemifusionsstadiums während der Membranfusion benötigt werden (Lundmark et al., 2008; Roth, 2008). Weiterhin kann PA als Substrat für verschiedene metabolische Enzyme dienen, um andere Lipide wie z.B. Diacylglycerol zu generieren, welches neben PA als bekanntes Fusogen in der Stimulation der Membranfusion involviert sein kann. Interessanterweise konnte die Mitwirkung von PA und Diacylglycerol bereits in der Fusion von embryonalen Myoblasten aus dem Hühnchen (Wakelam & Pettie, 1984) als auch in murinen C2C12 Myoblasten (Abramovici & Gee, 2007) demonstriert werden. Da Arf-GTPasen über die Aktivierung der PLD in der Synthese von PA wirken können, kann spekuliert werden, dass Schizo möglicherweise über die Synthese von speziellen Phospholipiden die Fusion der Membranen einleitet. Studien mit entsprechenden Markern oder immunhistochemischen Färbungen sollten in der Zukunft klären, ob ähnliche Lipide auch während der Myoblastenfusion in *Drosophila* beteiligt sind und diese von Schizo abhängen.

Kürzlich wurde zudem postuliert, dass die in der Myoblastenfusion von *Drosophila* auftretenden elektronen-dichten Vesikel vom *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) abstammen und über einen Aktin-basierten Mechanismus an die Fusionsstelle transportiert werden (Kim et al., 2007). Interessanterweise regulieren Arf-GTPasen die Bildung von intrazellulären Transportvesikeln am Golgi-Apparat (Reviews: Spang, 2002; Robinson et al., 2004; Donaldson et al., 2005; Kawasaki et al., 2005). Es kann daher auch spekuliert werden, dass Schizo in der Synthese der elektronen-dichten Vesikel involviert ist. Um dieser Vorstellung nachzugehen, müssten zunächst die folgenden Sachverhalte untersucht werden. Elektronen-dichte Vesikel konnten bisher nur für den zweiten Fusionsschritt beschrieben werden, können jedoch aufgrund der sehr transienten Natur dieser Strukturen und der Schnelllebigkeit der Fusion für den ersten Fusionsschritt nicht komplett ausgeschlossen werden. Da Schizo bereits für die initiale Fusion von FCs und FCMs benötigt wird, liegt die primäre Aufgabe darin, die ultrastrukturellen Merkmale des ersten Fusions schrittes zu charakterisieren. Im Anschluss daran sollte die ultrastrukturelle Charakterisierung von *schizo* Mutanten erfolgen. In diesen sollten die elektronen-dichten Vesikel entweder nicht mehr vorhanden sein oder misslokalisieren. Weiterhin sollte die Aufklärung der intrazellulären Lokalisation von Schizo in Zellen mit spezifischen Markern als auch in den Myoblasten mit Hilfe von immuno-elektronenmikroskopischen Studien entscheidende Einblicke liefern, ob Schizo in der Nähe der TGNs lokalisiert und möglicherweise in der Generierung der elektronen-dichten Vesikeln involviert ist.

4.3.3. Schizo interagiert mit den Kontakt-vermittelnden Rezeptoren der Ig Superfamilie

Auf der anderen Seite existiert weiterhin die Möglichkeit, dass Schizo nicht in der Bereitstellung von elektronen-dichten Vesikeln oder die Membrandynamik veränderten Lipiden fungiert, sondern die Fusion über die Interaktion mit den Transmembran-Rezeptoren der Ig-Superfamilie kontrolliert. Diese leiten die Fusion über die Erkennung und Adhäsion zwischen den Myoblasten ein und dienen als Signalplattform, um intrazelluläre Proteine zu rekrutieren und das Fusionssignal zu transferieren. Neben dem Multidomänen-Protein Rolling Pebbles (Rols, auch Antisocial Ants genannt) wird auch Schizo in *Drosophila* S2-Zellen und in Abhängigkeit von den Rezeptoren Duf und Rst an die Punkte des Zell-Zell-Kontaktes rekrutiert (Chen et al., 2003; Menon et al., 2005; Bulchand et al., 2010). Im Gegensatz zu Rols (Kreisköther et al., 2006) konnte jedoch keine direkte Interaktion zwischen Schizo und der intrazellulären Domäne von Duf im Hefe-Zwei-Hybrid-System festgestellt werden (diese Arbeit, persönliche Mitteilung S. Önel). Interessanterweise benötigt das Säuger Homolog von Schizo, Brag2/Arf-GEP100, Tyrosin-phosphorylierte Reste in der zytoplasmatischen Domäne von Rezeptoren, um mit ihnen zu interagieren (Morishige et al., 2008; Scholz et al., 2010). Auch Duf beinhaltet in seiner zytoplasmatischen Region vier Phosphorylierungsstellen (Strünkelnberg et al., 2001, Bulchand et al., 2010), so dass eine fehlende Phosphorylierung möglicherweise eine Interaktion im Hefe-Zwei-Hybrid-System verhindert hat. Im Einklang dessen konnte eine Relevanz der Phosphorylierungsstellen in der Membrantranslokation von Schizo, aber nicht von Rols, in *Drosophila* S2-Zellen demonstriert werden (Bulchand et al., 2010). Daher ist anzunehmen, dass die Interaktion von Schizo mit Duf in der Tat über Phosphorylierung reguliert wird. Weiterhin unterstützen die Hefe-Zwei-Hybrid-Daten die Vermutung von Bulchand et al. (2010), dass die Rekrutierung von Schizo und Rols an die intrazelluläre Domäne von Duf unterschiedlichen Mechanismen unterliegt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Rettungsexperimente weisen eindeutig darauf hin, dass Schizo auch eine Funktion in den FCMs ausübt (Kap. 3.2.1). Aus diesem Grund wurde zudem die Fähigkeit von Schizo mit der intrazellulären Domäne der anderen Transmembran-Rezeptoren Rst, Sns und Hbs zu binden, geprüft. Interessanterweise interagiert Schizo mit den intrazellulären Domänen von Rst und Sns, aber nicht mit der intrazellulären Domäne von Hbs (Kap. 3.2.2). Auch Hbs besitzt konservierte Phosphorylierungsstellen (Shelton et al., 2009), die für eine Interaktion mit Schizo relevant sein könnten. Fortführende Studien sind demzufolge nötig, um die Bindung von Schizo an die intrazellulären Domänen der Transmembran-Rezeptoren durch weitere Interaktionstests, wie z. B. Co-Immunpräzipitationen oder Fluoreszenz-Komplementationsanalysen (BiFC) zu verifizieren und die Relevanz der Phosphorylierungsstellen, z. B. durch phosphomimetische Mutationen, aufzuklären.

Weiterhin ist es notwendig, die *in vivo* Relevanz der Interaktion zwischen Schizo und den Transmembran-Rezeptoren der Ig-Superfamilie aufzuklären. Die Tatsache, dass Schizo in *duf*, *rst* Doppelmutanten nicht richtig lokalisiert ist (Chen et al., 2003), deutet darauf hin, dass Schizo auch während der Muskelentwicklung mit den Transmembran-Rezeptoren interagiert. Es stellt sich die Frage, welche Funktion die Interaktion von Schizo mit den Transmembran-Rezeptoren der Ig-

Superfamilie während der Myoblastenfusion haben könnte. Einerseits wird angenommen, dass die Transmembran-Rezeptoren als Signalplattform dienen, um intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren, welche z.B. zur lokalen F-Aktin-Polymerisierung führen (Önel & Renkawitz-Pohl, 2009). Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien konnten allerdings belegen, dass Schizo nicht in der Regulation der F-Aktin-Bildung involviert ist, welche in Abhängigkeit der Rezeptoren eingeleitet wird. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass Schizo die Verfügbarkeit der an der Kontaktstelle der Myoblasten lokalisierten Rezeptoren reguliert (Abb. 42). Schizo kodiert für einen Austauschfaktor für GTPasen der Arf-Familie, welche wichtige Regulatoren des intrazellulären Membrantransportes sind und in dem Recycling von Rezeptoren agieren (Madziva et al., 2006; Rankovic et al., 2009). Dem Vertebraten Homolog von Schizo, Brag2/Arf-GEP100, konnte bereits eine Rolle in dem Recycling verschiedener Rezeptoren zugewiesen werden, so z. B. von E-Cadherin (Hiroi et al., 2006) und von β 1-Integrin (Dunphy et al., 2006) während der Regulation der Zelladhäsion, sowie von dem EGF-Rezeptor während der Invasion von Tumorzellen (Morishige et al., 2008). Interessanterweise wurde *Drosophila* N-Cadherin, welches auch in Myoblasten exprimiert wird (Iwai et al., 1997), als Interaktionspartner von Schizo entdeckt (Diplomarbeit Verena Groth, 2008). Genetische Interaktionsstudien deuten bisher darauf hin, dass Schizo in Myoblasten als negativer Regulator von N-Cadherin fungiert (Doktorarbeit Verena Groth, 2010). Die Rolle von Schizo in dem Recycling von N-Cadherin, aber auch von Duf, Rst, Sns und Hbs sollte daher adressiert werden. Dies könnte durch die Bestimmung der Lokalisation der Rezeptoren in *schizo* Mutanten oder durch genetische Interaktionstest erfolgen.

Das Recycling der Transmembranmoleküle kann aus mehreren Gründen interessant für die Myoblastenfusion von *Drosophila* sein. In *Drosophila* vollzieht sich die Fusion als ein dynamischer, schnell ablaufender Prozess, bei dem die Erkennung, Adhäsion und Fusion der Myoblasten in durchschnittlich 11 Minuten abläuft (Richardson et al., 2008a). Da die Mehrheit der Myoblastenfusionen in *Drosophila* in einem Rahmen von ca. 2 Stunden stattfindet und einzelne Fusionen an einem Muskel kurz hintereinander stattfinden, muss ein Mechanismus vorhanden sein, welcher die schnelle Wiederbereitstellung der Transmembran-Rezeptoren gewährleistet. Das Recycling von Rezeptoren könnte eine solche Möglichkeit bieten. Erste Hinweise, dass endozytotisches Recycling von Rezeptoren für die Fusion von Myoblasten von Bedeutung ist, kommen aus Studien von Maus C2C12 Myoblasten. In diesen konnte gezeigt werden, dass das Recycling des C2-Domänen haltigen Transmembranmoleküls Myoferlin über Interaktion mit dem Eps15 Homology-Domain Protein, EHD2, reguliert wird (Doherty et al., 2008). Das Recycling von internalisierten Rezeptoren involviert den gerichteten Transport des endozytierten Cargos von dem frühen Endosom zu dem endosomalen Recycling Kompartiment und schließlich von diesem Kompartiment zurück an die Plasmamembran. Diese endosomalen Recycling Kompartimente, welche durch die Anwesenheit der Rab11-GTPase definiert sind, zeigen in Vertebraten Zellen eine juxta-nukleäre Lokalisation in der Nähe des Golgi-Kompartiments (Sönnichsen et al., 2000). Für die

Beteiligung von Rab11 in der Myoblastenfusion in *Drosophila* gibt es zudem bereits erste Hinweise. Bhui & Roy (2009) konnten zeigen, dass Rab11 in den Myoblasten exprimiert wird und dass die Einführung von dominant-negativen oder konstitutiv-aktiven Rab11 zu partiellen Defekten in der Myoblastenfusion führt. Die Tatsache, dass Schizo in COS-Zellen auch perinukleär lokalisiert, könnte darauf hindeuten, dass Schizo in endosomalen Recycling Kompartimenten zu finden ist. Um dies zu klären, sind Kolokalisationsstudien mit Rab11 in COS- und S2-Zellen als auch in Embryonen notwendig. Die Vermutung, dass Schizo in der posttranslationalen Regulation von Proteinen wirkt, wird weiterhin durch die Tatsache unterstützt, dass Schizo während der Bildung der Kommissuren die Expression von Slit über Endozytose reguliert (Önel et al., 2004).

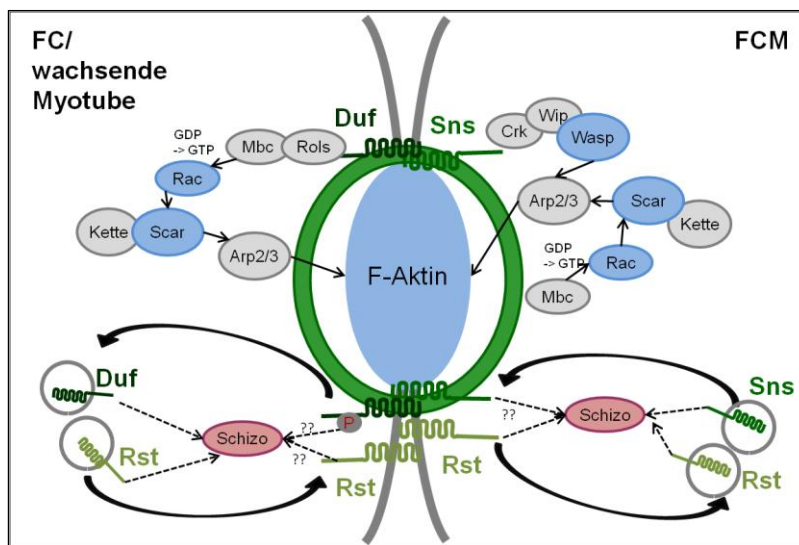


Abb. 42 Putative Funktion von Schizo im Recycling der Transmembran-Rezeptoren der Ig-Superfamilie
Schizo interagiert mit den intrazellulären Domänen von Rst, Sns und möglicherweise an phosphoryliertes Duf (P). Die *in vivo* Relevanz in der Myoblastenfusion ist noch nicht belegt, jedoch wäre eine Funktion von Schizo im Recycling der Transmembranmoleküle vorstellbar.

Die Daten aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-müssen dringend *in vivo* verifiziert werden, denn neben ihrer Funktion in der Myoblastenfusion werden die vier Transmembran-Rezeptoren aber auch für die Entwicklung des *Drosophila* Komplexauges benötigt. Dieses besteht aus etwa 800 einzelnen Photorezeptororganen, den Ommatidien, welche durch interommatidialen Pigmentzellen (IOP) und mechanosensorischen Borsten voneinander getrennt werden. Der Aufbau und die Aufrechterhaltung dieser hoch geordneten Struktur erfolgt durch Zell-Separation und benötigt eine präferentielle heterotypische Interaktion zwischen IOPs und den primären Pigmentzellen der Ommatidien. Dies wird interessanterweise in Analogie zur Myoblastenfusion über die zelltypspezifische Expression der Transmembran-Rezeptoren vermittelt, wobei Rst und Duf in den IOPs, und Sns und Hbs in den primären Pigmentzellen der Ommatidien, in funktioneller Redundanz agieren (Bao et al., 2010; Review: Fischbach et al., 2009). Die Störung der Zellseparation durch Reduktion oder Überexpression der Transmembran-Proteine (Boschert et al., 1990; Reiter et al., 1996; Dworak et al., 2001, Grillo-Hill

& Wolff, 2009; Bao et al., 2010) in den Photorezeptorzellen führt zu einem rauen Augenphänotyp, bei dem die reguläre Struktur des Ommatidienverbandes gestört ist und es zur gelegentlichen Verschmelzung von einzelnen Ommatidien kommt. Auch die Überexpression von Schizo in den Photorezeptorzellen führt zu einem solchen rauen Augenphänotyp (Diplomarbeit V. Groth), was darauf hindeuten könnte, dass Schizo andererseits auch während der Separation der Ommatidien mit den Transmembran-Rezeptoren interagiert. Aufgrund der Tatsache, dass Sns-Duf positive als auch Hbs-Rst positive Vesikel in den primären Pigmentzellen beobachtet werden konnten (Bao et al., 2010), kann spekuliert werden, dass Schizo über vesikulären Transport die Oberflächenverfügbarkeit der Rezeptoren kontrolliert, ein ähnliches Szenario, wie es auch für die Myoblastenfusion vorstellbar ist.

Weiterhin werden die Transmembran-Rezeptoren der Ig-Superfamilie für die heterophile Interaktion zwischen den Vorläuferzellen der sensorischen Organe benötigt (Venugopala Reddy, 1999; Fischbach et al., 2009). Da Schizo ebenfalls in sogenannten Proneural-Clustern transkribiert wird, aus denen sich die sensorischen Vorläuferzellen entwickeln (Reeves & Posakony, 2005), ist zudem eine Interaktion zwischen Schizo und den Transmembran-Rezeptoren während der Entwicklung der sensorischen Organen möglich.

Die Aufklärung der Bedeutung der *in vitro* beobachteten Interaktion zwischen den Rezeptoren und Schizo in den einzelnen Geweben könnte somit neue Einblicke in die vielfältigen Funktionen von Schizo während der Entwicklung des multizellulären Organismus *Drosophila* liefern.

4.3.4. Arf-GTPasen könnten eine zusätzliche Funktion bei der Anheftung der Muskeln spielen

Die erfolgreiche Etablierung einer funktionellen Muskulatur setzt nicht nur die Spezifikation und Fusion der Myoblasten voraus, sondern fordert gleichermaßen eine stabile Verankerung der Muskeln mit dem Exoskelett von *Drosophila*, um den für die Lokomotion notwendigen Widerstand bei den Muskelkontraktionen zu bieten. Ein Fehler in der Adhäsion der Muskeln führt zu der Ablösung und folglich der Abrundung der Muskeln. Ein solcher Muskelphänotyp konnte nach Überexpression von GTP-gebundenem D-Arf1 oder GDP-gebundenem D-Arf2 beobachtet werden (Kap. 3.3.2.4; Kap. 3.3.2.6), was darauf hindeuten könnte, dass D-Arf1 und D-Arf2 eine weitere Rolle in der Anheftung der Muskeln spielen. Die präzise Funktion der Arf-GTPasen bei der Anheftung der Muskeln ist zu dem derzeitigen Standpunkt nicht eindeutig geklärt. Eine Erklärungsmöglichkeit bietet die Funktion von D-Arf1 in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts. In Vertebraten kooperieren Arf1, Cdc42 und Wasp in der Arp2/3 vermittelten Aktin-Polymerisierung während der Vesikelbildung am Golgi-Apparat oder in der Clathrin-unabhängigen Endozytose von Glycosylphosphatidylinositol-verankerten Proteinen (GPI-APs) an der Plasmamembran (Chen et al., 2004; Matas et al., 2004; Kumari & Mayor, 2008). Eine kürzlich veröffentlichte Studie hat zudem gezeigt, dass ein vergleichbarer Signalweg auch in *Drosophila* Zellen die Endozytose von GPI-APs reguliert (Gupta et

al., 2009), so dass sich die Frage stellt, ob D-Arf1 auch während der Muskelanheftung mit Wasp und Cdc42 kooperiert. Interessanterweise konnte sowohl für Wasp als auch für Cdc42 bereits eine Funktion in der Adhäsion der Muskeln gezeigt werden (Schäfer et al., 2007). Dosis-sensitive genetische Interaktionsstudien zwischen *d-arf1* und *cdc42*, bzw. *d-arf1* und *wasp* sind notwendig, um ein Zusammenspiel dieser Faktoren während der Muskelanheftung aufzuklären.

Die Ablösung der Muskeln kann andererseits aber auch ein Resultat davon sein, dass die Proteine, welche die Adhäsion der Muskeln an die Epidermis vermitteln, misslokalisieren oder abwesend sind. In *Drosophila* wird die Anheftung der Muskeln durch die heterodimeren Integrin-Rezeptoren gewährleistet, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Die Sekretion der beiden Integrin-Untereinheiten erfolgt zumindest in den Epithelzellen des *Drosophila* Follikels über distinkte Mechanismen. Während die α - Untereinheit einen unkonventionellen, Golgi-unabhängigen Transportweg nutzt, folgt die β -Untereinheit der Integrin-Rezeptoren jedoch dem typischen ER-Golgi-Transportweg (Schotmann et al., 2008). Da sowohl die homologen Proteine von Arf1 als auch von Arf2 für die Aufrechterhaltung der Golgi-Funktion verantwortlich sind (Donaldson et al., 2005), besteht somit auch die Möglichkeit, dass die Überexpression von dominant-negativen oder dominant-aktiven Formen der Arf-GTPasen mit der normalen Golgi-Funktion interferiert und der Transport der Adhäsions-vermittelnden Integrin-Rezeptoren negativ beeinflusst ist. Dieser Fragestellung kann durch immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die Untereinheiten der Integrin-Rezeptoren oder deren akzessorischen Proteinen nachgegangen werden.

4.4. Die Funktion des Arf-GAPs D-Git in der Myogenese von *Drosophila*

4.4.1. Der Arf-GAP D-Git ist kein Regulator der Myoblastenfusion

Der Arf-GEF Schizo ist eine essentieller Faktor der Myoblastenfusion, der vermutlich in der Aktivierung der D-Arf1-GTPase wirkt. Da sowohl die Lokalisation als auch die Funktion der Arf-GTPasen strikt an den GDP/GTP-Zyklus der Arf-GTPasen gekoppelt ist, ist es offensichtlich, dass auch die Inaktivierung durch sogenannte GTPase aktivierende Proteine (Arf-GAPs) eine entscheidende Rolle in der Regulation der Funktionsweise der Arf-GTPasen spielt. Dies scheint insbesondere auch für die Myoblastenfusion von Bedeutung zu sein, da auch die Überexpression von GTP-gebundenem D-Arf1 in Fusionsstörungen resultiert. Aus diesem Grund wurden die 10 putativen Arf-GAP kodierenden Gene (Tabelle 6) hinsichtlich ihrer mRNA-Verteilung untersucht (Kap. 3.5.1). Interessanterweise konnte nur die mRNA von *CG16728/d-git* und von *rhoGap15B* spezifisch im somatischen und viszerale Mesoderm und während fusionsrelevanter Stadien detektiert werden (Abb. 25) was zunächst auf eine Rolle in der Myoblastenfusion hingedeutet hat. Die Generierung und phänotypische Analyse einer Mutante für *d-git* hat jedoch gezeigt, dass der Verlust von D-Git keine Fusionsstörungen hervorruft und nicht in embryonaler Letalität resultiert (Kap. 3.5.451), so wie es für typische Fusionsmutanten der Fall ist. Zudem kann eine maternal bereitgestellte mRNA (Bahri et al.,

2009) sowie eine funktionelle Redundanz mit RhoGAP15B (Kap. 3.5.5) als mögliche Ursache für den fehlenden Fusionsdefekt ausgeschlossen werden. Das D-Git-Protein konnte außerdem frühestens im Stadium 15 detektiert werden, einem Stadium in dem der Großteil der Fusion abgeschlossen ist. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass D-Git wahrscheinlich nicht in dem Fusionsprozess involviert ist.

Daher stellt sich weiterhin die Frage, welcher Arf-GAP Inaktivierung der Arf-GTPasen während der Myoblastenfusion übernimmt. Die abgeleiteten Proteine der Arf-GAP kodierenden Gene *CG6838*, *drongo* (*CG3365*), *CG30372*, *cenB1A* (*CG6742*), *cenG1A* (*CG31811*), sowie *rhoGAP100F* (*CG1976*) können aufgrund ihrer mRNA Verteilung ausgeschlossen werden (Kap. 3.5.1). Hingegen könnte *CG8243* aufgrund seiner ubiquitären mRNA-Verteilung für eine Rolle in der Myoblastenfusion in Frage kommen. *CG8243* kodiert für das *Drosophila* Homolog der Arf-GAPs der SMAP-Unterfamilie. In Vertebraten existieren zwei SMAP Proteine, SMAP1 und SMAP2, welche über die direkte Interaktion mit Clathrin in dem intrazellulären Transport von Clathrin-bedeckten Vesikeln involviert sind (Tanabe et al., 2008). In SMAP1 reguliert die Arf6 vermittelte Endozytose von Rezeptoren, wie z.B. von E-Cadherin (Tanabe et al., 2005; Kon et al., 2008), während SMAP2 den Arf1-abhängigen Transport von Endosomen zum TGN kontrolliert (Natsume et al., 2006). Da ursprünglich ein Arf-GAP für die D-Arf1-GTPase gesucht wurde, sollte die Interaktion *CG8243* mit D-Arf1 und D-Arf6 analysiert werden, um zu entscheiden, ob eine funktionelle Ähnlichkeit des von *CG8243* abgeleiteten Proteins mit SMAP1 oder SMAP2 vorliegt.

Genomische Defizienzen für *CG8243* zeigen jedoch keinen Fusionsdefekt (Daten nicht gezeigt), dies könnte einerseits an der maternalen mRNA Bereitstellung von *CG8243* liegen (Tabelle 6). Neben dem von *CG8243* abgeleiteten Protein existiert zudem ein weiterer Arf-GAP, Gap69C, dessen mRNA während der gesamten Entwicklung transkribiert wird (Frolov & Alortsev, 2001). Gap69C repräsentiert das *Drosophila* Homolog von ArfGAP1, welcher in Vertebraten über die Inaktivierung von Arf1 den COPI-Vesikeltransport am Golgi-Apparat reguliert (Spang et al., 2002; Donaldson et al., 2005). Auch *Drosophila* Gap69C fungiert als ein Arf-GAP für D-Arf1 (Raghu et al., 2009). Die Tatsache, dass es an D-Arf1 wirkt, könnte ein weiterer Hinweis für eine Bedeutung von Gap69C für die Myoblastenfusion sein. Ähnlich wie für *CG8243* ist in Mutanten für *gap69C* jedoch kein Fusionsdefekt zu erwarten, da diese homozygot lebensfähig sind (Frolov & Alortsev, 2001). Studien in Hefe haben interessanterweise gezeigt, dass die homologen Proteine von SMAP und ArfGAP1, Age2 und Gcs1 überlappende Funktionen in dem *post*-Golgi-Transport haben (Poon et al., 2001). Daher besteht die Möglichkeit, dass auch die *Drosophila* Proteine in der Lage sind, sich gegenseitig zu ersetzen. Die Analyse von *CG8243Df; gap69C* Doppelmutanten könnte erste Hinweise darüber liefern. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Überexpression der Arf-GAPs in Fusionsstörungen resultiert, da in diesem Fall die regulierte Arf-GTPase überwiegend in dem inaktiven Zustand vorliegen sollte.

4.4.2. Der ArfGAP D-Git kontrolliert die Wegfindung der Muskeln zu ihren epidermalen Anheftungsstellen

Bei der phänotypischen Analyse der *d-git* Deletionsmutante konnten zwar keine Fusionsdefekte, jedoch interessanterweise Fehler in der Wegfindung der Muskeln (Kap. 3.5.4.1) beobachtet werden. Für diesen als „ByPass“-Phänotyp bezeichneten Phänotyp ist charakteristisch, dass die Muskeln ihre spezifischen Anheftungsstellen nicht erkennen und infolgedessen über ihr eigentliches Ziel hinauswachsen. Dies könnte darin begründet sein, dass die Muskeln nach dem Erreichen ihrer Anheftungsstelle nicht in der Lage sind, Stop-Signale wahrzunehmen oder andere umgebende Signale zu interpretieren. In zygotischen *d-git* Mutanten trifft dies insbesondere auf die posterior-ventral orientierten ventralen Muskeln VO4/5/6 zu, wobei die ventralen Enden der Muskeln zu weit auf die ventrale Mittellinie hinzuwachsen. Eine interessanter Aspekt könnte dabei sein, dass die ventralen Enden der VO5/6 Muskeln die Einzigen sind, die bis in das nächste folgende Segment zu migrieren haben und daher der Wegfindungsdefekt in diesen Muskeln in zygotischen Funktionsverlustmutanten von *d-git* am auffälligsten ist.

Es existieren einige Hinweise, dass der Wegfindungsphänotyp aufgrund einer Funktion von D-Git in den Muskeln und nicht in den epidermalen Anheftungsstellen beruhen. Erstens wird *d-git* mRNA bereits früh in den Myoblasten transkribiert (Abb. 27). Zweitens hängt die Expression von D-Git von den mesodermal exprimierten Transkriptionsfaktoren Mef2 und Lmd ab (Daten nicht gezeigt & Sandmann et al., 2007; Cunha et al., 2010). Drittens reichert sich das D-Git Protein an den Muskelanheftungsstellen auf der Seite des Muskels an (Kap. 3.5.6). Zudem ist mesodermal exprimiertes D-Git ausreichend, um den Wegfindungsphänotyp der *d-git* Mutanten zu retten (Bahri et al., 2009).

4.4.3. D-Git wirkt als ein ArfGAP für die D-Arf6 GTPase

Aber was sind die zugrunde liegenden Mechanismen mit denen D-Git die Wegfindung der Muskeln beeinflusst? D-Git wurde aufgrund seiner Eigenschaft analysiert, als Arf-GAP in der Inaktivierung von Arf-GTPasen zu fungieren. Vertebraten Git Proteine zeigen keine Präferenz für eine Arf-GTPase *in vitro* (Vitale, et al., 2000), wirken jedoch *in vivo* überwiegend als negative Regulatoren der Arf6 GTPase (Albertinazzi et al., 2003; Nishiya et al., 2005). Genetische Interaktionsstudien deuten darauf hin, dass *Drosophila* Git während der Wegfindung der Muskeln mit der D-Arf6 GTPase, jedoch nicht mit der D-Arf1 GTPase kooperiert (Kap. 3.5.7.1). In *d-arf6*, *d-git* Doppelmutanten ist dabei der Anteil der fehlgeleiteten ventralen Muskeln erhöht, sowie die Form der ventralen Muskeln verändert. Der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen D-Git und der D-Arf6 GTPase schlug jedoch fehl (Kap. 3.5.7.3), so wie es bereits auch in Studien des Vertebraten Git der Fall war (Di Cesare et al., 2000). Die Überexpression von D-Git sollte eine Aktivierung von D-Arf6 verhindern und ein inaktives D-Arf6 zurücklassen. Der Befund, dass die mesodermale Expression von vollständigem D-Git bzw. der Arf-GAP-Domäne alleine jedoch nicht in Defekten der Wegfindung der Muskeln resultiert

(Kap. 3.5.7.4), könnte wie folgt erklärt werden: D-Git ist ein Multidomänen-Protein, welches ähnlich wie die Vertebraten Homologe (Totaro et al., 2007) wahrscheinlich einer komplexen räumlichen und zeitlichen Regulation unterliegt. Obwohl das vollständige D-Git Protein ähnlich wie endogenes D-Git Protein an den Enden der Muskel lokalisiert, besteht die Möglichkeit, dass nur eine begrenzte Anzahl von regulatorischen Proteinen zur Verfügung steht und daher nur ein geringer Anteil des überexprimierten D-Git aktiviert wird. Im Gegensatz zu dem vollständigen D-Git Protein konnte die isolierte GAP-Domäne nicht an den Enden der Muskeln detektiert werden, was darauf hindeutet, dass das Proteinfragment nicht stabil ist oder nicht richtig lokalisiert. Daher kann anhand dieses Experimentes keine Aussage über die Funktion der GAP-Domäne in den Muskeln getroffen werden. Auch die mesodermale Überexpression eines D-Git-Proteins, welchem die katalytische GAP-Domäne fehlt, konnte keinen Phänotyp hervorrufen. Es ist möglich, dass die Überexpression von D-Git Δ Gap im wildtypischen Hintergrund keinen dominanten Phänotyp bewirkt und das endogene Protein noch in der Lage ist, seine normale Funktion zu vollziehen. Es wäre daher interessant, die Auswirkungen der Überexpression von D-Git Δ GAP im *d-git* mutanten Hintergrund zu analysieren. In diesen Embryonen ist ein Wegfindungsdefekt zu erwarten. Da D-Git Δ GAP über keinen zusätzlichen, detektierbaren Anhang verfügt, konnte bisher nicht untersucht werden, ob das Deletionsprotein in den Muskeln korrekt lokalisiert. Ein D-Git Δ GAP Konstrukt mit zusätzlichem FLAG-Anhang existiert und steht für fortführende Analysen bereit.

Obwohl die Möglichkeit besteht, dass D-Git die Wegfindung der Myotuben über andere Signale reguliert, indizieren die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten genetischen Interaktionsexperimente und statistischen Analysen, dass D-Git und D-Arf6 während der Wegfindung der Muskeln kooperieren. In Vertebraten konnte eine ähnliche funktionelle Verbindung zwischen Git und Arf6 bei dem Auswachsen von primären Neuronen beobachtet werden (Albertinazzi et al., 2003), einem Prozess, dem das Auswachsen der Muskeln sehr ähnlich ist. Vergleichbar zu dem Wachstumskegel von auswachsenden Neuronen wird auch die Wegfindung oder die Migration der Muskeln in *Drosophila* durch die Ausbildung von Aktin-reichen Filopodien an den Enden der Muskeln begleitet, welche die Umgebung auf chemoattraktive oder repulsive Signale absuchen (Schnorrer & Dickson, 2004). Um auf solche Wachstumssignale reagieren zu können, müssen die Filopodien an den Enden der Muskeln in der Lage sein, eine dynamische Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts vorzunehmen, um entweder auf ein attraktives Signal hinzuwachsen oder sich aufgrund eines repulsiven Signals zurückzuziehen. Die Arf6-GTPase spielt eine wichtige Rolle in dem endosomalen Membrantransport, sowie einer Vielzahl von Aktin-basierten Vorgängen, wie z. B. der Ausbildung von Membranfortsätzen oder der Zelladhäsion und -migration (Donaldson, 2003). Daher sind folgende Funktionen von D-Git im Zusammenspiel mit D-Arf6 während der Migration der Muskeln vorstellbar. Auf der einen Seite könnte D-Git in Kooperation mit D-Arf6 den intrazellulären Membrantransport kontrollieren, so wie es bereits für Säuger Git als Regulator der Arf6-GTPase während dem gerichteten Wachstum von Neuronen postuliert wurde (Albertinazzi et al., 2003). Die Internalisierung

und das Recycling von Membranen bietet eine Möglichkeit, um auf externe Stimuli zu reagieren, welche zur Verlängerung oder zum Rückzug der neuronalen Wachstumszonen führen (Craig et al., 1995). Die für den Vesikeltransport notwendige Assoziation von Git mit intrazellulären Vesikeln wird in Vertebraten über die Ankyrin-Wiederholungen (ANK) vermittelt (Matafora et al., 2001). Interessanterweise werden auch die ANK-Wiederholungen in *Drosophila* für die Lokalisation von D-Git benötigt, was auf einen ähnlichen intrazellulären Transport-Mechanismus von D-Git und einer Rolle in Membrantransport während der Migration der Muskeln hinweist.

Andererseits wirken Git Proteine als Koordinatoren der Arf und Rac-GTPase Signalwege während der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskelettes. Insbesondere interagiert und kolokalisiert das Vertebraten Homolog von D-Git, p95-APP, mit der Rac-GTPase in migrierenden Zellen (Di Cesare et al., 2000), was ein Hinweis für ein koordinatisches Zusammenspiel von D-Git, D-Arf6 und Rac sein könnte. Aktiviertes Rac wird typischerweise an der führenden Seite von migrierenden Zellen gefunden (Kraynov et al., 2000). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass mit Integrinen-assoziiertes Git die Ausbildung von Membranfortsätzen an der zurückbleibenden Seite von CHO- oder HEK-Zellen über die Repression der Rac1-Aktivität verhindert (Nishiya et al., 2005; Frank et al., 2006). Die Inhibition von Rac benötigt dabei die Aktivität der Arf-GAP Domäne von Git und ist somit an die Inaktivierung der Arf-GTPase gekoppelt (Nishiya et al., 2005). Es ist daher vorstellbar, dass nach erfolgtem Kontakt mit der Anheftungsstelle die Inhibition der D-Arf6-Aktivität an den Muskelenden durch den Arf-GAP D-Git zu einer lokalen Repression von aktivem Rac führt. Dies könnte das Auswachsen und die weitere Migration der Muskelenden beenden. In diesem Szenario würde der Verlust von D-Git und D-Arf6 zu einer unkontrollierten Rac-Aktivität führen, welche das extensive Wachstum der Muskeln erklären würde.

Zusammenfassend bieten diese Hypothesen eine neue Richtung, wie D-Git über die Regulation von D-Arf6 das komplexe Zusammenspiel zwischen dem intrazellulären Membrantransport und der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts während der Wegfindung der Muskeln regulieren kann.

4.4.3.1. Die Interaktion mit dem Adaptorprotein Paxillin bildet keine Verknüpfung zwischen der Wegfindung der Muskeln und der Integrin-vermittelten Adhäsion der Muskeln

Die Tatsache, dass die Muskeln in *d-git* Mutanten in der Lage sind, sich zu strecken und zumindest in die richtige Richtung zu wachsen, deutet zunächst darauf hin, dass der eigentliche zugrundeliegende Mechanismus der Migration durch den Verlust von D-Git nicht beeinflusst ist. Hingegen deutet der beobachtete Phänotyp darauf hin, dass die Muskeln ein verlängertes oder ungerichtetes Wachstum zeigen und nicht an ihrer wildtypischen Anheftungsstelle stoppen, um dort einen stabilen Kontakt mit der überliegenden Epidermis einzugehen. Die Frage, wie die erfolgreiche Adhäsion der Muskeln an die migrierenden Muskeln signalisiert wird, ist jedoch nicht bekannt. Das Multidomänen-Protein D-Git könnte jedoch eine solche Funktion übernehmen. Die Adhäsion der Muskeln an die epidermalen

Anheftungsstellen wird in *Drosophila* durch die heterodimeren Integrin-Rezeptoren gewährleistet (Bokel & Brown, 2000; Brown, 2000). In Vertebraten ist Git und seine assoziierten Proteine Pix und Pak funktionell über die Interaktion mit dem Adaptorprotein Paxillin an Integrin-haltige Adhäsionsstrukturen geknüpft. Auch die homologen Proteine in *Drosophila* zeigen ähnlich wie D-Git eine Anreicherung an den Enden der Muskeln (Harden et al., 1996; Hicks et al., 2001; Wheeler et al., 2001; Bahri et al., 2009) und D-Git, D-Pix und D-Pak kooperieren während der Wegfindung der Muskeln (Bahri et al., 2009). Die Tatsache, dass *paxillin* Mutanten nicht den für Integrin Mutanten typischen Ablösungsphänotyp zeigen (pers. Kommunikation Friedlander, EDRC 2009), könnte auf eine von der Anheftung der Muskeln unabhängige, zusätzliche Funktion von Paxillin in der Muskelentwicklung hinweisen. Eine Möglichkeit war, dass Paxillin über die Rekrutierung des D-Git/D-Pix/D-Pak-Komplexes eine Verknüpfung zwischen der Wegfindung der Muskeln und der stabilen Adhäsion an die Epidermis bildet. Eine direkte Interaktion zwischen D-Git und *Drosophila* Paxillin konnte im Hefe-Zwei-Hybrid-System in dieser Arbeit demonstriert werden (Kap. 3.5.8.1). Die präsentierten genetischen Interaktionsexperimente deuten jedoch darauf hin, dass diese Interaktion nicht für die Wegfindung und Adhäsion der Muskeln relevant zu sein scheint. Obwohl *d-git*, *pax* Doppelmутanten, in denen eine genomische Defizienz für *paxillin* verwendet wurde, einen verstärkten Defekt in der Wegfindung der Muskeln zeigen, konnte dies nicht bei Verwendung von hypomorphen *paxillin* Allelen beobachtet werden (Kap. 3.5.8.2). In beiden Fällen konnte kein Anheftungsdefekt beobachtet werden. Die Interaktion mit Paxillin scheint zudem nicht für die Lokalisation von D-Git an den Muskelanheftungsstellen verantwortlich zu sein, da das Fehlen der Paxillin-Bindestelle (PBS) nicht die Lokalisation der in den Muskeln exprimierten D-Git-Variante an die Muskelanheftungsstellen verhindert (Kap. 3.5.8.3). Vertebraten Git Proteine haben neben der C-terminalen PBS zudem eine weitere potentielle PBS, die sich vor den Ankyrin-Wiederholungen befindet (West et al., 2001). Die Anwesenheit einer ähnlichen PBS in *Drosophila* ist auf der Basis von Sequenzvergleichen aber eher unwahrscheinlich. Im Einklang mit den in dieser Arbeit präsentierten Daten konnte zudem in immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden, dass endogenes D-Git in maternal und zygotischen *paxillin* Mutanten weiterhin an den Muskelanheftungsstellen lokalisiert (pers. Kommunikation Friedlander, EDRC 2009). Obwohl der hohe Grad der Konservierung sowie das übereinstimmende Expressionsmuster von Integrinen, Paxillin, D-Git, D-Pix und D-Pak an den Muskelanheftungsstellen anfänglich ein Zusammenwirken aller Faktoren vermuten ließ, zeigen diese Daten, dass Paxillin nicht als Adaptorprotein zwischen Integrinen und dem D-Git/D-Pix/D-Pak-Komplex fungiert. Weiterhin kann daraus interpretiert werden, dass es zumindest auf diesem Weg kein Wechselspiel zwischen der Integrin-vermittelten Adhäsion der Muskeln und dem Prozess der Wegfindung der Muskeln vorliegt.

Somit werden andere Mechanismen gefordert, welche die Lokalisation und das Zusammenspiel von D-Git, D-Pix und D-Pak-während der Wegfindung der Muskeln regulieren.

4.4.3.2. Die Funktionsweise von D-Git erfordert den Aufbau eines oligomeren Multiproteinkomplexes und ist möglicherweise in der Übertragung Muskel-spezifischer Signalwege involviert

Genetische Interaktionsstudien zwischen *d-git* und *d-pak*, sowie die Tatsache, dass die Funktion von D-Git für die Lokalisation von D-Pak zu den Muskelanheftungsstellen benötigt wird (Bahri et al., 2009), deuten bereits an, dass D-Git und D-Pak in den Muskeln in dem gleichen Signalweg wirken. Die Fragestellung, wie D-Git die Lokalisation von D-Pak kontrolliert und wie externe Signale wahrgenommen werden, können daher neue Einblicke in die Funktionsweise von D-Git bieten.

Hierin können einige Hinweise präsentiert werden, dass bereits die Zusammensetzung des D-Git/D-Pix/D-Pak-Komplexes für die Funktionsweise von D-Git von Bedeutung ist. In Analogie zu den Vertebraten Proteinen (Turner et al., 1999; Di Cesare et al., 2000; Zhao et al., 2000; Brown et al., 2002; Premont et al., 2004) interagiert D-Git mit D-Pak indirekt über den Austauschfaktor D-Pix (Bahri et al., 2009). Die Pix-bindende Region von Git Proteinen wird dabei der Spa-Homologie-Domäne (SHD) von Git zugordnet (Premont et al., 2000; Zhao et al., 2000). Im Einklang damit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die SH-Domäne von *Drosophila* Git für die Muskelentwicklung relevant ist. Interessanterweise konnte die Expression einer D-Git Variante mit deletierter SH-Domäne in den Muskeln die Notwendigkeit der SH-Domäne für die korrekte Lokalisation von D-Git demonstrieren (Kap. 3.5.9). Dies indiziert, dass die Interaktion zwischen D-Git und D-Pix nicht nur eine Voraussetzung für die Funktionsweise von D-Git ist, sondern bereits einen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisation von D-Git ausübt. In Vertebraten sind zudem sowohl Pix und Git1 jeweils in der Lage, Homodimere zu bilden und formen zusammen einen konstitutiv-assoziierten Multiproteinkomplex (Kim et al., 2001; Kim et al., 2003; Paris et al., 2003; Premont et al., 2004; Schlenker & Rittinger, 2009). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit auch eine homotypische Interaktion von *Drosophila* Git im Hefe-Zwei-Hybrid-System gezeigt werden (Kap. 3.5.10). In Übereinstimmung dessen wird die Coiled-Coil-Struktur, welche wahrscheinlich die Homodimerisierung von D-Git vermittelt, für die Lokalisation von D-Git zu den Muskelanheftungsstellen benötigt (pers. Kommunikation Friedlander, EDRC 2009). Diese Daten deuten darauf hin, dass D-Git über Homodimerisierung und die SH-Domänen vermittelte Interaktion mit D-Pix auch während der Muskelentwicklung einen oligomeren Komplex bestehend aus mehreren Molekülen D-Pix und D-Git aufbaut (siehe Abb. 43), welcher die gleichzeitige Bindung mehrerer regulatorischer Proteine ermöglicht. Da die Aktivierung von Vertebraten Pak eine Konzentrierung von Pak an dem oligomeren Git-Pix-Komplex voraussetzt (Loo et al., 2004), könnte dies einen Mechanismus darstellen, wie D-Git die Funktion von D-Pak reguliert und wieso D-Pak in *d-git* Mutanten misslokalisiert.

Die Frage, durch welche externe Signale D-Git reguliert wird bzw. wie diese Signale an D-Git transferiert werden, scheint durchaus komplexer als zu Beginn angenommen. Die hauptsächliche Herausforderung, die es zu klären gilt, ist die Frage, wieso D-Git und seine assoziierten Proteine

nahezu in den Enden aller Muskeln lokalisieren, jedoch zygotische Funktionsverlustmutanten nur einen Wegfindungsdefekt in einem bestimmten Teil der Muskeln zeigt und wie dies auf molekularer Ebene koordiniert wird. Zu dem Zeitpunkt dieser Arbeit ist jedoch erst wenig über die Mechanismen bekannt, welche der Wegfindung in den spezifischen Muskelgruppen unterliegen. Bei den bisher bekannten Faktoren handelt es sich überwiegend um Genprodukte, die aus der axonalen Wegleitung bekannt sind. Unter diesen zeichnen sich Mutanten des Slit/Robo2-Signalweges ähnlich wie *d-git* Mutanten durch einen sogenannten „Bypass-Phänotyp“ der ventralen Muskeln aus (Kramer, 2001). Während der Wegleitung der Axone rekrutiert Slit die Kinase D-Pak über das SH2-SH3-Adaptorprotein Dock an den Robo-Rezeptor (Fan et al., 2003). Die im Rahmen der Bachelorarbeit von Irene Hofer zu dieser Arbeit angrenzenden genetischen Interaktionsexperimente indizieren interessanterweise, dass D-Git spezifisch in den ventralen Muskeln in einem vergleichbaren Slit/Robo-Signalweg integriert ist (Bachelorarbeit Irene Hofer, 2010). Einen weiteren aufschlussreichen Befund über die Muskel-spezifische Funktion von D-Git bietet die in der vorliegenden Arbeit beschriebene phänotypische Analyse der *git^{Aa}, Df(2L)ED1231* Doppelmutante, welche ursprünglich für die Analyse des Zusammenspiels zwischen D-Git und Paxillin benutzt wurde. In dieser Doppelmutante wachsen die ventralen Muskeln, aber vor allem die lateralen Transversalmuskeln (LT) extensiv über ihre Anheftungsstelle hinaus (Kap. 3.5.8.2). Interessanterweise befindet sich in der benutzten Defizienz *Df(2L)ED1231* die kodierende Region für die Rezeptortyrosinkinase Derailed (Drl), welche spezifisch in den LT-Muskeln exprimiert und zell-autonom für die Wegleitung der LT-Muskeln benötigt wird (Calahan et al., 1996). Obwohl diese Experimente mit einer spezifischen Mutante für *drl* wiederholt werden und der dahinterliegende Signalweg noch aufgeklärt werden muss, deutet dies darauf hin, dass D-Git spezifisch in den LT Muskeln mit Drl kooperiert.

Zusammenfassend können diese Daten wie folgt interpretiert werden: D-Git nimmt möglicherweise die Wachstumssignale von verschiedenen bekannten Wegleitungs-Rezeptoren wahr, in den ventralen Muskeln des Slit-Robo Signalweges und in den LT Muskeln durch Drl (siehe Abb. 43). Dabei wäre D-Git das erste identifizierte Molekül, welches während der Wegfindung der Muskeln durch die Integration in muskelspezifische Rezeptorsignalwege differentiell auf externe Wegleitungssignale reagiert, jedoch über einen ähnlichen Mechanismus die Wegleitungsinformation an das Aktin-Zytoskelett und/oder den Vesikeltransport überträgt.

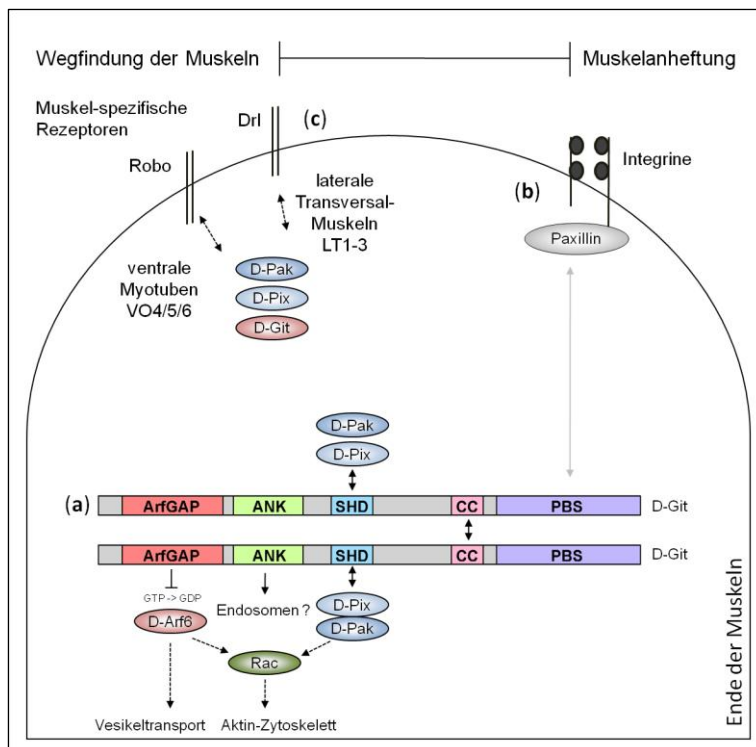


Abb. 43 Model zur Funktionsweise von D-Git in der Übertragung Rezeptor-spezifischer Signale während der Wegfindung der Muskeln

(a) D-Git stellt ein Domänen-reiches Protein dar, welches über den Aufbau eines Multiproteinkomplexes bestehend aus D-Pix und D-Pak die Wegleitung der Muskeln reguliert. Die Zusammensetzung und Funktion dieses Komplexes benötigt die Spa-Homologie-Domäne (SHD) von D-Git und Homodimerisierung der Git-Moleküle. (b) Obwohl D-Git physikalisch mit Paxillin interagiert, scheint diese Bindung nicht für die Koordination zwischen Integrin-vermittelter Adhäsion und der Wegfindung der Muskeln relevant zu sein (grauer Pfeil). (c) Im Gegensatz dazu existieren Hinweise, dass D-Git spezifisch in den einzelnen Muskelgruppen über die Integration von Muskel-spezifischen Rezeptorsignalwegen in der Übertragung externer Wegleitungssignale involviert ist. Der Robo-Signalweg oder die Derailed (Drl)-Rezeptortyrosinkinase bilden Beispiele dafür. (a) Die Umsetzung solcher Signale erfolgt wahrscheinlich über die D-Arf6-vermittelte Kopplung zwischen Membrantransport und der Umgestaltung des Aktin-Zytoskeletts an den Enden der Muskeln.

Durchgezogene Linien zeigen nachgewiesene Interaktionen, gestrichelte Linien deuten auf vermutete Interaktionen und Signalwege.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. Material

5.1.1. Chemikalien

Chemikalien wurden von den folgenden Herstellern bezogen:

Fluka, Neu-Ulm

Gibco, Eggenstein

National Diagnostics

Merck, Darmstadt

Roche, Mannheim

Roth, Karlsruhe

Sigma-Aldrich, Steinheim

5.1.2. Allgemeine Lösungen

dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP in A.dest lösen Lagerung aliquotiert bei -20°C
EDTA	0,5 M EDTA
Heparin	50 mg/mL Lösen von EDTA erfolgt bei 60°C. Lagerung bei RT.
IPTG	50 mg/mL
Lachsperma-DNA	10 mg/mL Denaturierung für 20 min bei 100°C, danach Lagerung aliquotiert bei -20°C
Proteinase K	20 mg/mL Lagerung aliquotiert bei -20°C
RNase Stocklösung	50 mg/mL
RNase Wasser	10 mg/mL in A.dest
X-Gal	100 mg/mL in 100 % DMF, Lagerung bei -20°C im Dunkeln
X-Phosphat/BCIP	50 mg/mL in 100 % DMF Lagerung bei -20°C im Dunkeln

5.1.3. Allgemeine Puffer

10x PBS	1,3 M NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄ autoklavieren
1x PBT	1 x PBS 0,1 % (v/v) Tween ²⁰
10x TE	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5) 10 mM EDTA autoklavieren

5.1.4. Verwendete Enzyme

Accu-Prime™- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase High Fidelity	Invitrogen, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Lysozym	Serva, Heidelberg
Proteinase K	AppliChem
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim MBI Fermentas, Heidelberg Roche, Mannheim
RNase A	Boehringer, Mannheim
Sp6-RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	peQLAB, Erlangen Axon, Kaiserslautern
T3-RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, Heidelberg
T7-RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Vent DNA-Polymerase	New England BioLabs

5.1.5. Verwendete Kits und Sonstiges

Biotin RNA Labeling Mix	Roche, Mannheim
Concanavalin A	Sigma, München
Dan Klorix (Natriumhypochlorid)	Colgate Palmolive, Hamburg
DIG RNA Labeling and Detection Kit	Roche, Mannheim
Epoxidharz-Einbettungs Kit	Fluka, Née-Ulm
E.Z.N.A.® Plasmid Minipräp-Kit I	peQLAB, Erlangen
Fluoromount-G™	
Hybond N-Membran	Amersham, Braunschweig
In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye Frankreich
JETsorb Kit (Gelelution)	Genomed, Bad Oeynhausen
JETstar Plasmid Midiprep Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Mass Ruler DNA-Ladder Mix #0403/ Low Range #0383/ High Range #0393	MBI Fermentas, Heidelberg
MATCHMAKER LexA Two-Hybrid System	Clontech-Takara Bio Europe
pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
TOPO TA Cloning® Kit Dual Promoter	Invitrogen, Karlsruhe
TransFectin™ Lipid Reagent	Biorad, München
TSA™ Biotinyl Tyramide Reagent Pack (NEL700A)	Perkin Elmer
TSA™ Fluorescein Tyramide Reagent Pack (SAT701001EA)	Perkin Elmer
TSA™ Tetramethylrhodamine Tyramide Reagent Pack (SAT702001EA)	Perkin Elmer
Vectastain Elite ABC StandardKit	Vector Laboratories
Zero Blunt TOPO® Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe

5.1.6. Geräte

Binokular	StemiSV6, Zeiss
Fluoreszenz-Binokular	Olympus ZSX9 mit Halogen-Lampe
Elektronikrührer	Variomag, H+P, München
Elektrophoreseapparaturen	Werkstatt, Universität Marburg
Elektropulsgerät	EasyjecT Basic, Equibio
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan2 mit Axiocam, Zeiss
Konfokales Laser Scan Mikroskop	Leica TCS SP2 (FB Biologie) Leica TCS SP2 AOBS (AG Jacob, Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps Universität Marburg)
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus Instruments Megafuge 1.OR, Heraeus Instruments
Mikroinjektionsapparatur	5242 Hermle ZK 401, Eppendorf
Mikroskop (Fluoreszenz und Durchlicht)	Zeiss Axiophot mit Axiocam
Photometer	Biomate3, ThermoScientific
Schüttler	WT-12, Biometra
Stromgeber	Biometra Power Pac p25 , Biometra Power Pac 300
Thermoblock	Techne Dri-Block® DB 2A Thermo Dux, Wertheim
Thermocycler	TPersomal und Personal Cyclers, Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Biofuge pico, Heraeus Instruments PerfectSpin24, PeqLab
UV-Transluminator	Spektroline TS-302
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker 2400, Stratagene
Wärmebäder	Haake, GFL

5.1.7. Bakterienstämme

Es handelt sich hierbei ausschließlich um *Escherichia coli* Stämme.

DH5α	Chemokompetent/ Elektrokompentent <i>supE44, ΔlacU169 (√80lacZ.M15), hsdR17, recA1, endA1, grA96, thi-1, relA1</i> -> Klonierungs-Stamm
One Shot® TOP10 cells (Invitrogen)	Chemokompetent <i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG λ-</i>
One Shot® <i>ccdB</i> Survival™ 2T1 ^R (Invitrogen)	Chemokompetent <i>F⁻ mcrA Δ(mrr.hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG fhuA::IS2</i> -> zur Amplifizierung von <i>ccdB</i> -haltigen Plasmiden

5.1.8. *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

EGY48 [p8op-lacZ] MATa, *his3*, *trp1*, *ura3*, *LexA_{op(x6)}-LEU2*, *LexA_{op(x8)}-URA3*
 EGY48 transformiert mit zusätzlichem Reporter-Plasmid p8op-lacZ, das für ein lacZ-Gen unter der Kontrolle von LexA_{op(x6)} kodiert.
 (MATCHMAKER LexA Two-Hybrid System von Clontech, Heidelberg)

5.1.9. Verwendete PLasmide

Klonierungsvektoren

pBluescript II SK+/- Klonierungsvektor, Stratagene, Heidelberg
 pCR®-Blunt II-TOPO® Vektor zur Klonierung von blunt-PCR-Produkten, Invitrogen, Karlsruhe
 pCR®II-TOPO® Vektor zur Klonierung von Taq-Polymerase erzeugten PCR-Produkten mit TA Überhang, Invitrogen, Karlsruhe
 pENTR™/D-Topo® Vektor zur gerichteten Klonierung von PCR-Produkten mit CACC-Überhang Invitrogen, Karlsruhe
 pFLC-1 cDNA-Klonierungsvektor von BDGP
 Derivat des pBlueScriptII-SK(+). cDNA Sequenzen werden über *XhoI* am 5' Ende und *BamHI* am 3' Ende in den Vektor inseriert.
 pOT2 cDNA-Klonierungsvektor von BDGP
 cDNA Sequenzen direktional in die 5' *EcoRI* und 3' *XhoI* Schnittstelle

Expressionsvektoren

pECFP-C1 Vektor zur Generierung von N-terminalen Enhanced-CFP-Fusionsproteinen für die Expression in Säugerzellen, Clontech-Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
 pEYFP-C1/N1 Vektor zur Generierung von N-oder C-terminalen Enhanced-YFP-Fusionsproteinen für die Expression in Säugerzellen, Clontech-Takara
 pUASt Auf P-Element-Integration basierender Transformationsvektor für *Drosophila melanogaster*. (Brand and Perrimon, 1993).
 Insetierte Gene sind unter der Kontrolle von UAS-Elementen
 pUASt-attB-rfa-mCherry Auf $\phi 31$ -vermittelter Integration basierender Transformationsvektor zur Expression von C-terminalen EGFP- oder mCherry-Fusionsproteinen in *Drosophila* oder *Drosophila* Zellen. Insetierte Gene sind unter der Kontrolle von UAS-Elementen.
 pUASt-attB-rfa-GFP Klonierung über Gateway®-System in rfa-Stelle.
 Sven Bogdan, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Vektoren für das Hefe-Zwei-Hybrid-System

pGilda Vektor zur Erzeugung eines Fusionsproteins bestehend aus dem „Köder“-Protein und der LexA-DNA-Bindedomäne für das MATCHMAKER LexA Zwei-Hybrid System, Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
 pB42AD Vektor zur Erzeugung eines Fusionsproteins bestehend aus dem „Beute“-Protein und der B42-Aktivierungsdomäne für das MATCHMAKER LexA Zwei-Hybrid System. Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

Sonstige Vektoren und Plasmide

p $\pi 25.7wc$ Helferplasmid zur Transformation von P-Elementen. Kodiert für die Integrin von P-Elementen notwendige Transposase (Karess und Rubin, 1984).
 Duf-intra/pB42AD Intrazelluläre Domäne von Duf an B42-Aktivierungsdomäne fusioniert. Hefektor für Matchmaker II System (Diplomarbeit Nina Reichert, 2004).
 Sns-intra/pB42AD Intrazelluläre Domäne von Sns, Hbs oder Rst an die B42-Aktivierungsdomäne fusioniert. Hefektor für Matchmaker II System (Doktorarbeit K. B. Shankara Reddy, 2009).
 Hbs-intra/pB42AD
 Rst-intra/pB42AD
 pDsRed2-ER Rotes fluoreszierendes Protein aus *Discosoma sp* (DsRed2; 1, 2) fusioniert an ER-Zielsequenz von Calreticulin und ein ER-Retentionssignal KDEL, Clontech

5.1.10. Antibiotika, Medien und Agar-Platten

	Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml Amp 70 % EtOH	50-100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml Kan in 70 % EtOH	50 µg/ml
Chloramphenicol (Chl)	34 mg/ml	100 µg/ml
IPTG	1M	0,5 mM
X-Gal	100 mg/mL	50 µg/ml

LB Medium (nach Luria Bertani)	1 % (w/v) Pepton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	1 NaCl
	(4 % (w/v) Agar bei Platten)

Bei Zusatz von Antibiotika, IPTG oder X-Gal Medium autoklavieren, bis 60°C abkühlen lassen und anschließend die Zusätze hinzugeben.

5.1.11. Verwendete cDNA's

Die cDNA's wurden von Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) bezogen und als Matrize für PCR, sowie zur Herstellung von RNA-Sonden verwendet.

Tabelle 8 Verwendete cDNAs

cDNA Nummer	Gene	Vektor	Größe des Inserts (bp)	Bemerkungen
GH12888	<i>cenB1A</i> (CG6742)	pOT2	3264	---
LD22876	<i>arf51F</i> (CG8156)	pOT2	764	---
LD24904	<i>arf79F</i> (CG8385)	pOT2	1360	---
LD28013	<i>rhoGap100F</i> (CG1976)	pOT2	6284	Unvollständiger Leserahmen!!!
LD30319	<i>d-git</i> (CG16728)	pOT2	2530	---
LD32547	<i>rhoGap15B</i> (CG4937)	pOT2	5000	Nur 5' Sequenz in Flybase verfügbar
LD34217	<i>rac1</i> (CG2248)	pOT2	1710	---
LD46935	<i>CG6838</i>	pOT2	2354	---
LP17217	<i>CG30372</i>	pOT2	3808	---
RE02759	<i>CG8243</i>	pFLC-1	2422	---
RE07016	<i>cen1GA</i> (CG31811)	pFLC-1	4455	---
RE16882	<i>arf51F</i> (CG8156)	pFLC-1	1366	---
RE53354	<i>arf102F</i> (CG11027)	pFLC-1	728	---
RE63354	<i>gap69C</i> (CG4237)	pFLC-1	2099	---
SD04793	<i>pax</i> (CG31794)	pOT2	2234	---
SD08167	<i>rhoGap15B</i> (CG4937)	pOT2	4692	5' Ende fehlt
SD23838	<i>rhoGap100F</i> (CG1976)	pOT2	9025	Nur 5' Sequenz in Flybase verfügbar

5.1.12. Primer

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Eurofins, Ebersberg, bezogen. Die Orientierung ist in 5'→3' Richtung angegeben. Zusätzlich eingefügte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, kodierende Sequenzen für Tags sind kursiv hervorgehoben.

Sequenzierung *schizo* Allele

LP1489_seqSacI_rev	CTGACTGTCGAGCTCGATAT	Ex41-rev	TCCGAGAGGTAACACTAGA
LP1489_seqBgl_for	CGAACTCTACAAGATCTGC	Ex41-rev2	CCTCGTTTCCATGTATGTGG
LP1489_Sac_for	ATCGAGCTCGACAGTCAGCA	Ex42-for	CTTCGCTGCTAAGGACCAAT
LPex1-for	ACACAATTGCATGACGACGG	Ex42-for2	AGTGGCAGTAGCAAGAAGGT
LPex1-rev	TTTAAGTGCTGCCCAGCTG	Ex42-rev	TGCGTATCGTCTCCGACAT
LPex1-for2	GGCGTATACGCAATACGTGA	Ex42-rev2	TTGCGTATCGTCTCCGACAT
LPex1-rev2	GGCCTGTATCTATTATCTCAGA	Ex43-for	TGCTATCTCTCGCATACGA

ExRA-UTR-for	TTCCACGCATACACCTGCAT	Ex43-for2	TTATGCCGCTCAAATGCAGG
ExRA-UTR-rev	ACGGTTGGAGAAAGGCGATT	Ex43-rev	CAGATCCGTGTTTCAGCATGA
RE-ex1-for	AGCACATCGATTAGGAGTGC	Ex43-rev2	GGACTTGACACGGTCATAGA
RE-ex1-rev	GATATGCCATTAATTCACCT	Ex51-for	GGTAAGTCTGTCTAGCTAATCA
RE-5UTR-for	CTGTTTCCAAACGTCGAACG	Ex51-for2	GCACAAAAGATTGAGCGCCT
Siz-regregion-for	CACCTGGCATCATTGACTGA	Ex51-rev	CCATCTCGCTAATGGACTC
Siz-reg-mit-rev	ATTTCCACAACATGTGCCAC	Ex52-for	GGATGGCAAGATCTTGATCAC
Siz-reg-mit-for	CCAAGCCAAGGAAAAATCGA	Ex52-rev	AACCAGTCAGTAAAGTCTACAT
exRC-UTR-rev	TAGACGATAAGAGAACTTTTCGT	Ex5-for	CGAGATTCCTGACGTGAACA
exRD-for	CGCCTAGCAGTATTTATGCC	Ex56-rev	GACTGGAACGAGATGCTCAT
exRD-rev	CTGCAAAAATATGTCCTCCCG	Ex6-for	ATGCACGAGCAGTGTGAGTT
Ex2-for	AACGGTCTGCGAAAACGTATA	Ex6-rev	GGGTCGTTTCGATTTCGGATT
Ex2-rev	ATTCCCAGCTGAATCCACAC	Ex6-for2	AACGCTTAGAGCTTAAGTTCAA
Ex2-rev2	AACCTCCTGAACAATCCACC	Ex6-rev2	TGTTGAAGAAAATGGCGTTCCG
Ex2-rev3	CCGATTTAGAAAGCCACCTGT	Schizo-exon3-for	TACAGCCAGCAGTCTTGGAT
Ex3-for	ACCGGATGCCTCCAAATACT	Schizo-exon4-rev	GCCGAATAGTAGGGCGTGT
Ex3-for2	CACACATCGCACCTTCCATT	Schizo-exon5-for	ATCGAGCACCTGGCAATGC
Ex3-rev	TCACACTATTTGCTATCCAGG	Schizo-exon6-rev	TTGAGCCTGAGCCTGAGCT
Ex3-rev2	CGGATGAATCCCGAAGTCTT		
Ex41-for	ATGCTATCTTGCTTTGTAACAC		
Ex41-for2	GTTAAGTTATTGTGTCTGTAATC		

N-term Tags Schizo

HA_LPDelta_for (EcoRI)	CCACAGaattcACAatgtatccgtatgacgttccagattatgcaATGTCCAGGTGTG
V5-Schizo_for	AATTATGGGTAAGCCAATACCCAATCCTCTGCTTGGGCTAGACAGTACATCCAGGTGTGACAACCACAA

Sequenzierung Rac 1 Allele

Rac1-start-for	GTCGAGGAAATCGAACCATG	Rac1-rev	GATAAGACAGTGGCCTCAGT
Rac1-seq-for	ATCAGCTACACGACCAATGC	Rac1-end-rev	CCGACCAACTGTCTAACTCT
Rac1-seq-rev	TTTCAGACCCTTCTGCGTCA		

Mutagenese-Primer Arf1

Arf1act_for	TGTGGGTGGCttaGACAAAA
Arf1act_rev	TTTTGTCTaaGCCACCCACA
Arf1dn_for	GCCGCTGGTAAAaacACA
Arf1dn_rev	TTGTgttTTTACCAGCGGC
Arf2act_for	GGATGTTGGTGGCctaGACAAAATTCGCCCCGTTGTGG
Arf2act_rev	CCACAACGGGCGAATTTTGTCTagGCCACCAACATCC
Arf2dn_for	CTGCTGGAAAAaacACTATTCT
Arf2dn_rev	AGAATAGTgttTTTCCAGCAG
Arf6dn_for	AAAAaacACGATTCTGTACAAACTGAACTTGCCCAATC
Arf6dn_rev	GATTGGCCAAGTTTCAGTTTGTACAGAATCGTgttTTTT

Lokalisation P-Elemente Arf1

Arf1-500vorATG-rev	ATGAAACACGAGTCGCTTGC
Arf1-start-rev	GTTCGCGAATACGTTTCCCA

Bestimmung Arf1-Deletion

Arf1-CDS2-for	TGGAGGCACTACTTCCAGAA	Arf1-RE-UTR-rev	TATGGGTTGGTGAAATGCGG
Arf1-CDS3-rev	ATGCGCATCAACTCCTCTCT	Arf1-RC-UTR-for	CACCTATCTTTGCGCACTAC
Arf1-CDSend-rev	CTTCGGCTCGCTTGAATCA	Arf1-RC-UTR-rev	GTAGTGCGCAAAGATAGGTG
Arf1-CDSstart-for	GCATCCGAAAGACAAACAGC	arf1-2300-for	AGGATATCGGCTTCCAGCAA
Arf1-stop-rev	TTAGCGATTAGCGTTCTTCAAT	arf1-2500-for	GAAAGTCGTCAACGGAACAC
Arf1-RI-UTR-for	GTGAGCATTGTGCGACAATG	arf1-1800-rev	TATTCACCACAGCCGCGTAC
Arf1-RB-UTR-for	GTATTGGAAGCCGACGAAT	arf1-1800-for	GTACGCGGCTGTGGTGAATA
Arf1-RB-UTR-rev	ATTCGTGCGGCTTCCAATAC	arf1-3000-for	ACTCGGCTATGTGGCTTGT
Arf1-RE-UTR-for	CCGCATTTACCAACCCATA		

Bestätigung der Arf6-Deletion

Arf6-3UTR-rev	ACTCGTTACACCCTTGCTCA	Arf6-5UTR-for	ATGACACATCAGCACCATGG
Arf6-ex2-rev	AACAGATTGGCCAAGTTTCAG	Arf6-5UTR-for2	CCGTGTGCTAGCAAATGCAT

Klonierung in pENTR/D-Topo

Arf1-Ctag-for	caccATGGGAAACGTATTC	Siz-Ntag-for	caccTCCAGGTGTGACAACCACAA
Arf1-Ctag-rev	CATGCGATTAGCGTTCTTCAA	Siz-Ntag-rev	TTAGACCTCCGTCGACCGT
Arf2-Ctag-for	caccATGGGACTAACAATATCTAGT	Git-Ctag-for	caccATGTGTTTCGCCAGCAGTATAATC
Arf2-Ctag-rev	TTTTTTAGCCAATTCAGCTGATA	Git-Ctag-rev	ATAGAAGTGAACACCAAAGT
Arf6-Ctag-for	caccATGGGAAAGTTACTATCA	Arf6-Ctag-rev	CATTAAGTTATGGTTCGACGT

Konstrukte für Hefe-Zwei-Hybrid-System

Pax_YTH_EcoRI_for	gtcatgaattcGACGATTTGGATGCTCTATTA
Pax_YTH_XhoI_rev	catagctcgagTTTGGCAGCTGCGAATA
Pax_seq600_for	TGTCGAGGAGCAAATTGTGC
Pax_seq1200_for	TTCTGGACAAGTGCGTAACG
Git_YTH_MfeI_for	agtacaattgggcTGTTTCGCCAGCAGTATAATC
Git_YTH_MfeI_rev	acgccaatgAACTTCTATGTCGATGATTGTG
Gitfl_RI_infu_pB42AD_for	tgcctctcccgaattcTGTTTCGCCAGCAGTATAATC
Gitfl_RI_infu_pB42AD_rev	cgagtcgcccgaattcAACTTCTATGTCGATGATTGTG
Gitfl_RI_infu_pGil_for	cgactggctggaattcTGTTTCGCCAGCAGTATAATC
Gitfl_RI_infu_pGil_rev	ggatccccgggaattcAACTTCTATGTCGATGATTGTG
Git_Gap_EcoRI_for	agtagaattcCCCGGATTTGGATCATTCCGA
Git_Gap_XhoI_rev	tgtcactcgagTTATGAGCCATTGCCATCATCG
RG15_Gap_EcoRI_for	cgtagggaattcAAGATCTGGAGGCACATCATC
RG15_Gap_XhoI_rev	tcagctcgagctaCACCGCATCCTTAAGCGTT
Sec7PH_pGildaf (EcoRI)	gaattcAAGATGTCCGAGA
Sec7PH_pGildar (Xho)	ctcgagttacGACTCCATCTC
sizT1-pGil-RI-for	gtcagaattcTCCAGGTGTGACAACCACAA
sizT1-pGil-Xho-rev	cacgctcgagGAAGTGGCATAGCTCAAGTC
Arf1_pGildaf (EcoRI)	gaattcATGGGAAACGTATTCGCGAACTTATT
Arf1_pGildar (Xho)	ctcgagTTAGCGATTAGCGTTCTTCAAT
Arf2_pGildaf (EcoRI)	gaattcATGGGACTAACAATATCTAG
Arf2_pGildar (Xho)	ctcgagTTATTTTTTAGCCAATTCAG
Arf2_pB42AD_RI_for	agtagaattcGGACTAACAATATCTAGTCTT
Arf2_pB42AD_Xho_rev	atcactcgagTTATTTTTTAGCCAATTCAGCTG
Arf6_BamHI_pGilda_for	gtatggatccgtGGAAGTTACTATCAAAAATTTTC
Arf6_Xho_pGilda_rev	gcactcgagCTCATAACTTATGGTTCGACG
Arf6_fusion_for (XhoI)	attcgccgacctcgagATGGGAAAGTTACTAT
Arf6_fusion_rev (XhoI)	tccaaagcttcgagTACGATTGTCATAACTTATGGTT

YFP/CFP-Konstrukte

Arf1_fXhoC1_if	GGACTCAGATCTCGAGCTCGAGTAATGGGAAACGTATTC
Arf1_rXhoC1_if	GAAGCTTGAGCTCGAGCTCGAGTTAGCGATTACCG
Arf2_fXhoC1_if	GGACTCAGATCTCGAGCTCGAGCCATGGGACTAACAAT
Arf2_rXhoC1_if	GAAGCTTGAGCTCGAGCTCGAGTTATTTTTTAGCC
Arf6_fXhoC1_if	GGACTCAGATCTCGAGCTCGAGCTATGGGAAAGTTACTAT
Arf6_rXhoC1_if	GAAGCTTGAGCTCGAGCTCGAGTACGATTCTCATAACTTATGCTT
Arf1YFP-if-for	GGACTCAGATCTCGAGATGGGAAACGTATTC
Arf1YFP-if-rev	GAAGCTTGAGCTCGAGGCGATTAGCGTTCTTCAATTG
Arf2YFP-if-for	GGACTCAGATCTCGAGATGGGACTAACAATATCTAGT
Arf2YFP-if-rev	GAAGCTTGAGCTCGAGTTTTTTAGCCAATTCAGCTGATA
Arf6YFP-if-for	GGACTCAGATCTCGAGATGGGAAAGTTACTATCA
Arf6YFP-if-rev	GAAGCTTGAGCTCGAGTAAGTTATGGTTCGACGTTAA
SizCFP-C-for	TGCTTACTACACTAGTTACCATGGATCACCGCACG
sizCFP-C-rev	ATCCATGGTAAGTACTAGTGGGTCGTTTCGATTTCGATT
siz-CFP-if-for	GGACTCAGATCTCGAGATTCCAGGTGTGACAACCACAA
siz-CFP-if-rev	GAAGCTTGAGCTCGAGAAATAGATGACTTAGACCTCCG

Analyse Jumpout *d-git*

CG16728-vorstart-for	TCGGTATTCTATTTTCGTATCT	CG16728-2000-for	AGGTAGAAGTCCAAATGTAGAA
CG16728-start-for	ATGTGTTTCGCCAGCAGTATA	CG16728-2000-rev	TTCTACATTTGGACTTCTACCT
CG16728-start-rev	TATACTGCTGGCGAAACACAT	CG16728-2000-rev (55°C)	GCGGTGGCGTATGCACA
CG16278-400-rev	ATGGAGTGCATCCTTGGGC	CG16728-2300-for	ACGTGGTGCAGATGCTGTC
CG16728-500-for	TCTCCAGGATGACGATGATG	CG16728-2300-rev	GACAGCATCTGCACCACGT
CG16728-500-rev	CATCATCGTCATCCTGGAGA	CG16728-2300-rev (55°C)	CAGCATCTGCACCACGT
CG16728-600-rev	AGAAGCGCAGTGAAGTCTCT	CG16728-2500-for	TGATCTGAGCTTGAGCAGTC
CG16728-800-for	GCCAACAATCATAACACCAT	CG16728-2500-rev	GACTGCTCAAGCTCAGATCA
CG16728-800-rev	ATGGTGTTATGATTGTTGGC	CG16728-2500-rev (55°C)	TAGCGACAGAGGCTCG
CG16728-1200-for	AGTGGCCGCCACATGATTAT	CG16728-2800-for	CCACATGGAGAGCTTATACG
GC16728-1300-for	TGTTTGAGGAGCTGGTCATG	CG16728-2800-rev	CGTATAAGCTCTCCATGTGG
CG16728-1300-rev	CATGACCAGCTCCTCAAACA	CG16728-stop-rev	CTCAATAGAACTGCAACACCA
CG16728-1500-for	TTTGAGCGCCACGCGCAAT	EY09254-3-0-for	GGAGTGCAAGTGAGACAACT
CG16728-1800-for	CAGTGCCACCAATGGCCC	EY09254-3-100-for	TTGAATGTCGGCGAAATTGTTT
CG16728-1800-rev	GGGCCATTGGTGGCACTG	EY09254-3-500	TGAGAGTGAAAGCTCTTAGT
CG16728-1800-rev (55°C)	TCGTACATGGCATCAAGCAG	EY09254-5-0	TTACGAAAGTTACACCTGTTTG
Git-1850-rev	CTTACGCTTCTAGCCAAAGC		

pUASt Konstrukte *d-git*

HA-CG16728-BglII-for	atagatctatgtatccgtatgacgttcagattatgcaTGTTTCGCCAGCAGTATAATC
CG16728-BglII-for	TGGagatctGAATGTGTTTCGC
CG16728-dArfGAP-HindIII-for	CTCCaagcttGACGATGATGGCAATGGC
CG16728-dArfGAP-HindIII-rev	CGAaagcttTCGTGGGTGTGGCT
CG16728-dAnk-HindIII-for	gaaagcttcgACCGACAGGATCATTACCTT
CG16728-dAnk-HindIII-rev	tctaagcttCCAGACAGCCCGCTG
CG16728-seq-for	CGACAGGATCATTACCTTCC
GitdSHD_Hindfor	acgtaagcttATCTGGTTCGACAAGCACCC
GitdSHD_Hindrev	gatgcaagcttAATCTTCAGTTGCTCGCTTAT
GitdPBS_FlagNotrev	tgtctagcggccgcatcaCTGTGTCATCGTCATCCTTGTAATCCAGATCAATGCGAAGTGCGT
CG16728-FlagNot-rev	cttgccggccgctcaCTGTGTCATCGTCATCCTTGTAATCATAGAACTGCAACACCAAAGTC
CG16728-NotI-rev	TTTgcccgcTCAATAGAACTG
GitGAP-GFP-EcoRI-for	gatcgaattcATGCCGATTGATCATTCGCA
GitGAP-GFP-XhoRI-rev	cacctcgagcTGAGCCATTGCCATCATCG
Git-C-BglII-for	gtacagatctATGACCGACGTGCTCGTCG

pUASt Konstrukt *pax*

HAPax-EcoRI-for	gtcagaattcatgtatccgtatgacgttcagattatgcaGACGATTGATGCTCTATTA
-----------------	--

Lokalisation Paxillin P-Elemente

Pax-CDS2-rev	TTGCAGGTCGGCTAATAGAG
Pax-CDS3-rev	TCTCTACGCTGTAGTGCTCT
F03922-rev	TCGGTTTGTCTGGACCACTA

Vektoren spezifische Primer

M13-for	GTAAAACGACGGCCAG	gil-for (pGilda)	CGTCAGCAGAGCTTCACCATTG
M13-rev	CAGGAAACAGCTATGAC	gil-rev (pGilda)	CGTTTTAAACCTAAGTGTCAC
Sp6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	pB42AD-for	CCTGACTGGCTGAAATCGAATGGT
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	pB42AD-rev	TTCTGGCAAGGTAGACAAGC
pUA3EC	CTGCAACTACTGAAATCTGCC	5-pEYFP-C1	TATATAAGCAGAGCTGGTTTAGT
pUA5XB	TCTCTGTAGGTAGTTTGTC	3-pEYFP-C1	ATGTGGTATGGCTGATTATGA
eGFP-pUASt-seq-for	TCACCTCTCGGCATGGA	pEYFP-f	AGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC
pUASt-hspprom-for	AGTGCAAGTTAAAGTGAATCAATt	pEYFP-r	TGAAATTTGTGATGCTATTG
pUAS-rfa-EGFP-rev	TGCAGATGAACTTCAGGGTC	pYFP-rev2	TGTAACCATTATAAGCTGCAAT
pUAS-rfa-mCherry-rev	ATCTCGAACTCGTGGCCGTT		

P-Element spezifische Primer

EY3F	CCTTTCACCTCGCACTTATTG	5R1	GCGTCGACGTTCCAAGGCGTGCTAAAGGATG
EY3R	GTGAGACAGGATATGATTGT	5F1	GACGCATGATTATCTTTTACGTGAC

5.1.13. Primäre Antikörper

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten primären Antikörper angegeben. In Klammer ist die jeweilige Verwendung der entsprechenden Verdünnung angegeben, dabei steht IH für Immunohistochemie und WB für Western Blot.

Tabelle 9 Primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	eingesetzte Verdünnung	Referenz
α - β -Galaktosidase (α - β -Gal)	Kaninchen (polyklonal)	1:5000 (IH)	Cappel, Rockland, Biomol GmbH, Hamburg
α - β -Galaktosidase (α - β -Gal)	Maus (monoklonal)	1:5000 (IH)	Promega, Mannheim
α - β 3-Tubulin	Kaninchen (polyklonal)	1:5000 (IH)	Buttgereit <i>et al.</i> , 1996; Leiss <i>et al.</i> , 1988
α - β 3-Tubulin	Meerschweinchen (polyklonal)	1:5000 (IH)	Buttgereit <i>et al.</i> , 1996; Leiss <i>et al.</i> , 1988
α -D-Git	Kaninchen (polyklonal)	1:50 +TSA	Diese Arbeit
α -FLAG	Kaninchen (polyklonal)	1: 500 (IH)	Cell Signaling
α -FLAG	Kaninchen (polyklonal)	1:300-500 (IH)	Covance
α -GFP (ab6556)	Kaninchen (polyklonal)	1: 500-1:1000 (IH)	Abcam, Cambridge
α -GFP	Maus (monoklonal)	1: 1000	Covance
α -HA	Maus (monoklonal)	1:4000 (IH) 1:1000 (WB)	Cell signaling
α -V5	Kaninchen (polyklonal)	1: 500 (IH)	Covance

5.1.14. Sekundäre Antikörper

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten sekundären Antikörper angegeben. Die Wahl des sekundären Antikörpers richtet sich nach der Herkunft des primären Antikörpers. Die biotinylierten, HRP-gekoppelten sekundären Antikörper werden für immunhistochemische Färbungen verwendet.

Tabelle 10 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Referenz
α -DIG-AP (Fab-Fragment) (Alkalische Phosphatase konjugiert)	1:5000 (Sonden-Test) 1: 2000 (<i>in situ</i>)	Roche, Mannheim
α -Kaninchen-IgG, biotinyliert, HRP gekoppelt (Ziege)	1:400 (IH)	Vector Laboratories
α -Kaninchen, Cy2, Cy3 bzw. Cy5 gekoppelt (fluoreszierend)	1:200 (IH)	DIANOVA, Hamburg
α -Maus, Cy2 bzw. Cy3 gekoppelt (fluoreszierend)	1:200 (IH)	DIANOVA, Hamburg
α -Maus-IgG, biotinyliert, HRP gekoppelt (Ziege),	1:400 (IH)	Vector Laboratories
α -Meerschweinchen-IgG, biotinyliert, HRP gekoppelt (Ziege)	1:400 (IH)	Vector Laboratories
α -Meerschweinchen- Cy2, Cy3 bzw. Cy5 gekoppelt (fluoreszierend)	1:400 (IH)	Vector Laboratories

5.1.15. Fliegenstämme

5.1.15.1. Marker und Balancer

Kreuzungsgenetisch wird in *Drosophila* zwischen Marker- und Balancer-Chromosomen unterschieden. Marker-Chromosomen tragen rezessiv letale, phänotypisch dominante Mutationen in einem Gen. Balancer-Chromosomen tragen zusätzlich chromosomale Umbauten, größtenteils Inversionen, die Crossover zwischen Chromosomen unterdrücken, weil alle Crossover-Gameten als Folge einer Kombination aus Dublikationen und Deletionen letal sind. Dies ist insbesondere für die Haltung von mutanten Allelen wichtig und notwendig. Weiterhin sind auf Balancer-Chromosomen oft zusätzliche Reporterplasmide integriert, die Reporter wie z. B. β -Galaktosidase oder GFP unter Kontrolle von embryonal oder larval aktiven Promotoren exprimieren und damit die Unterscheidung zwischen homozygot und heterozygot mutanten Embryonen ermöglichen.

Tabelle 11 Häufig verwendete Marker und Balancer

Bezeichnung	Chromosom	Marker (M)/Balancer (B)	Kurze Beschreibung/Merkmale
<i>If</i>	2	M	<i>Inflated If</i> : verschmälerte Augen und verschmolzene Ommatidien
<i>Sp</i>	2	M	<i>Sternopleura (Sp)</i> : erhöhte Anzahl an Borsten auf der Sternopleuralplatte
<i>Dr</i>	3	M	<i>Drop Dr</i> : Dominanter Augenmarker (schmaler)
<i>FM7c P{ftz-LacZ}</i>	X	B	<i>P{ftz-LacZ}</i> : <i>LacZ</i> exprimiert in der <i>ftz</i> -Domäne (Streifenmuster)
<i>CyO</i>	2	B	<i>Curly CyO</i> (geschwungene Flügel);
<i>P{hg-LacZ}</i>			<i>P{hg-LacZ}</i> : <i>LacZ</i> exprimiert im Hinterdarm
<i>CyO P{wg-LacZ}</i>	2	B	<i>Curly CyO</i> (geschwungene Flügel);
(= <i>CyO^{bb}</i>)			<i>P{wg-LacZ}</i> : <i>LacZ</i> exprimiert in der <i>wg</i> -Domäne (Streifenmuster)
<i>TM3 Sb e</i>	3	B	<i>TM3</i> Balancer-Chromosom; <i>Stubble Sb</i> : verkürzte thorakal Borsten;
<i>P{Dfd-LacZ}</i>			<i>ebony e</i> : dunkle Körperfarbe;
(= <i>TDlz</i>)			<i>P{Dfd-LacZ}</i> : <i>LacZ</i> exprimiert im Maxillar-Segment
<i>TM3 Sb</i>	3	B	<i>TM3</i> Balancer-Chromosom; <i>Stubble Sb</i> : verkürzte thorakal Borsten;
<i>P{Ubx-lacZ}</i>			<i>P{Ubx-lacZ}</i> : <i>LacZ</i> exprimiert in der <i>ubx</i> -Domäne (Streifenmuster)
<i>TM2 Ubx e</i>	3	B	<i>TM2</i> Balancer-Chromosom; <i>Ultrabithorax Ubx</i> : verdickte Haltere,
			zusätzliche Borste auf Halterenstiel; <i>ebony e</i> : dunkle Körperfarbe
<i>TM2 Ubx e</i>	3	B	<i>TM2</i> Balancer-Chromosom; <i>Ultrabithorax Ubx</i> : verdickte Haltere,
<i>P{PNS-LacZ}</i>			zusätzliche Borste auf Halterenstiel; <i>ebony e</i> : dunkle Körperfarbe
(= <i>TM2^{bb}</i>)			<i>P{PNS-LacZ}</i> <i>LacZ</i> exprimiert im peripheren Nervensystem
<i>TM6 Tb e Hu</i>	3	B	<i>TM6</i> Balancer-Chromosom; <i>Tubby Tb</i> : Verkürzte, dicke Puppen,
<i>P{ftz-LacZ}</i>			<i>Humeral Hu</i> : zusätzliche Humoral-Borste(n); <i>ebony e</i> : dunkle
(= <i>TM6^{bb}</i>)			Körperfarbe; <i>P{ftz-LacZ}</i> <i>LacZ</i> exprimiert in der <i>ftz</i> -Domäne
<i>MKRS Sb</i>	3	B	<i>MKRS</i> Balancer-Chromosom; <i>Stubble Sb</i> : verkürzte thorakal Borsten
<i>CyO P{twiGal4}</i>	2	B	<i>Curly CyO</i> (geschwungene Flügel); <i>P{twi::Gal4}P{UAS::2xEGFP}</i> :
<i>P{UAS2xEGFP}</i>			Expression von EGFP im Mesoderm

Marker (M) oder Balancer-Chromosom (B). Dominante Merkmale sind großgeschrieben, rezessive Merkmale kleingeschrieben.

5.1.15.2. Mutanten

Tabelle 12 Mutanten

Bezeichnung	Genotyp	Mutation	Gen	Referenz
<i>arf6¹</i>	<i>w⁺; arf6¹</i>	1709 bp Deletion	<i>d-arf6</i> (<i>arf51F</i>)	Dyer et al., 2007
BL6674	<i>y[1] w[*]; Rac1[J11]</i> <i>P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}2A/</i> <i>TDlz, Sb</i>	G60E	<i>rac1</i>	Ng et al., 2002
<i>schizo^{CI-28}</i>	<i>schizo^{CI-28}/TDlz, Sb</i>	Nicht bekannt	<i>schizo</i>	Önel et al., 2004
<i>schizo^{U112}</i>	<i>schizo^{U112}/TDlz, Sb</i>	Nicht bekannt	<i>schizo</i>	Önel et al., 2004
<i>wasp³</i>	<i>wasp³/TDlz, Sb</i>	Deletion, die in einer Verschiebung des Leserahmens nach Pro-373 und zu einem Stop nach 114 zusätzlichen AS führt	<i>wasp</i>	Ben-Yaacov et al., 2001
<i>wasp^{3D3-035}</i>	<i>wasp^{3D3-035}/TDlz, Sb</i>	<i>L472Stop</i>	<i>wasp</i>	Schäfer et al., 2007

5.1.15.3. Deletionsstämme

Tabelle 13 Deletionsstämme

Bezeichnung	Genotyp	Bruchpunkte	Deletion von
BL906	Df(1)D15, v[1] f[1]/C(1)DX, f[1]; Dp(1;4)r[+]/+	14D1;15C5, 13F1-14A2;16A2-C2;12F2-3	<i>rhoGap15B</i>
BL3138	Df(2L)b87e25/CyO hg-LacZ	34B12-C1-;35B10-C1	<i>CG31811</i>
BL3785	Df(2L)VA17, Ddc[VA17] pr[1]/CyO hg LacZ	37C1;37F5	<i>pax</i>
BL3897	Df(2L)b88f32/CyO g LacZ	34D2-3;34E2-3	<i>CG31811</i>
BL4370	Df(3L)Delta1AK, ru[1] h[1] ry[506] sr[1] e[s] ca[1]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]	79E5-F1;79F2-6	<i>CG6838</i>
BL5913	w[*]; Df(3L)F10/TM3, Ser[1]	69A2;69D1	<i>Gap69C</i>
BL5931	fs(3)66EFa[S17]/TDlz Sb	69A2;69D1	<i>gap69C</i>
BL5951	w[*]; Df(3L)HD1/TDlz Sb	79D3-E1;79F3-6	<i>CG6838, kette!!</i>
BL6069	Df(2L)Sco7/CyO hg-LacZ	34D5;35D5-7	<i>CG31811</i>
BL6090	Df(2R)G75, bw[1]/CyO hg-LacZ	44F4-5;44F9-11	<i>CG8243</i>
BL6092	Df(2L)b80e3, Dp(2;2)GYS, pr[1] bw[1]/CyO hg LacZ	34C4-35A4 (Df), 34D1-2;35C1-3;50A4 (Dp)	<i>CG31811</i>
BL6647	Df(2R)BSC22/CyO hg LacZ	56D7-E3;56F9-12	<i>CG6838</i>
BL7538	w[1118]; Df(2R)Exel6056, P{w[+mC]=XP-U}Exel6056/CyO hg LacZ	44A4;44C2	<i>CG30372</i>
BL7672	w[1118]; Df(3R)Exel6193, P{w[+mC]=XP-U}Exel6193/TM6B, Tb[1]	94B3;94E4	<i>cenB1A (CG6742)</i>
BL7859	w[1118]; Df(2R)Exel7094, P+PBac{XP5.RB3}Exel7094/CyO hg LacZ	44A4;44B4	<i>CG30372</i>
BL8102	w[1118]; Df(3L)ED5017, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED5017/TM6 C, cu[1] Sb[1]	80A4;80C2	<i>arf79F = d-arf1</i>
BL8108	Df(2R)17/CyO	47A;47D	<i>d-git (CG16728)</i>
BL8583	Df(3R)BSC56, st[1] ca[1]/TM2	94E1-2;94F1-2	<i>cenB1A (CG6742)</i>
BL8909	w[1118]; Df(2R)ED2076, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED2076/SM6a	47A10;47C1	<i>d-git (CG16728)</i>
BL8954	Df(1)ED7374, w[1118] P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED7374/FM7h	15A1;15E3	<i>rhoGAP15B (CG4937)</i>
BL9063	w[1118]; Df(2R)ED1791, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED1791/CyO hg-LacZ	44F7;45F1	<i>CG8243</i>
BL9064	Df(2R)ED2426/CyO hg-LacZ	51E2;52B1	<i>arf51F = d- arf6</i>
BL9174	w[1118]; Df(2L)ED1231, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED1231/CyO hg-LacZ	37C5;37E3,	<i>pax</i>
BL9277	w[1118]; Df(2R)ED2098, P{w[+mW.Scer\FRT.hs3]=3'.RS5+3.3'}ED2098/CyO hg-LacZ	47A7;47C6	<i>d-git (CG16728)</i>
ME178	<i>Df(3L)ME178 (A. Carpenter)</i>	78A7-B1; het	<i>schizo</i>

5.1.15.4. P-Element-Insertionen

Tabelle 14 P-Element Insertionen

Bezeichnung	Genotyp	Insertion	betroffenes Gen
BL15461	y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Rac1[EY05848]/TDlz, Sb	61F5	<i>rac1</i>
BL16251	y[1] w[1118]; PBac{y[+mDint2]=3HPy[+]}Arf79F[C005]/TDlz, Sb	80B1	<i>arf79F = d-arf1</i>
BL17076	P{EP}Arf51F[EP2612]/CyO	51F	<i>arf51F = d-arf6</i>
BL17547	y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}EY09254	47B1	<i>d-git (CG16728)</i>
BL19877	y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2}Arf79F[EY08473]	80B1	<i>arf79F = d-arf1</i>
<i>c06996</i>	PBac{PB}Pax ^{c06996}	37D6	<i>pax</i>
<i>f03922</i>	PBac{WH}Pax ^{f03922}	37D6	<i>pax</i>
<i>scar</i> ^{k13811}	y ¹ w ^{67c23} ; P{lacW}SCAR ^{k13811} / CyO	32C1	<i>scar</i>

5.1.15.5. Gal-4 Treiberlinien

Gal4-Treiberlinien bewirken in Abhängigkeit des jeweiligen Promotors/Enhancer die gewebe- und stadienspezifische Expression des aus Hefe stammenden Transkriptionsaktivators Gal4.

Tabelle 15 Gal4-Treiberlinien

Bezeichnung	Chromosomale Insertion	Kurze Beschreibung/Merkmale	Referenz
P{GawB}how[24B] (24B-Gal4)	3	Expression von Gal4 im embryonalen Mesoderm	BL1767; Brand and Perrimon, 1993
<i>dmef2</i> -Gal4	3	Expression von Gal4 im <i>dmef2</i> Muster (gesamtes Mesoderm, St. 11-15)	Ranganayakulu et al., 1996
<i>rP298</i> -Gal4 (<i>duf</i> -Gal4)	X	Expression von Gal4 im <i>duf/kirre</i> Muster (Founderzellen, Precusormuskeln)	Menon and Chia, 2001
<i>rP298</i> -Gal4; <i>schizo</i> ^{C1-28}	X; 3	Expression von Gal4 im <i>duf/kirre</i> Muster im <i>schizo</i> ^{C1-28} mutanten Hintergrund	S. Önel
<i>sg24</i> -Gal4 (<i>twi</i> -Gal4)	2	Expression von Gal4 im <i>twi</i> Muster (gesamtes Mesoderm, Stadium 7-12)	A. Michelson, Baylies and Bate, 1996
<i>sns4,5</i> -Gal4	2	Expression von Gal4 im <i>sns4,5</i> -Muster (Fusionskompetente Myoblasten des somatischen und viszerale Mesoderm, nach Fusion in den Muskeln)	Stute et al., 2006
<i>snspro3</i> -Gal4	2	Expression von Gal4 im <i>sns4,5</i> -Muster (Fusionskompetente Myoblasten des somatischen und viszerale Mesoderm, nach Fusion in den Muskeln)	S. Abmayr
<i>TGX twi</i> -Gal4	X	Expression von Gal4 im <i>twi</i> Muster (gesamtes Mesoderm, Stadium 7-12)	A. Michelson, Baylies and Bate, 1996
<i>TGX</i> ; <i>schizo</i> ^{C1-28}	X; 3	Expression von Gal4 im <i>twi</i> Muster im <i>schizo</i> ^{C1-28} mutanten Hintergrund	S. Önel
<i>wg</i> -Gal4	2	Expression in der <i>wg</i> -Domäne (Streifenmuster)	Packard et al., 2000

5.1.15.6. UAS-Effektorstämme

Sogenannte UAS-Effektorstämme tragen Gen-Varianten unter Kontrolle von UAS-regulatorischen Elementen, die durch Bindung von Gal4 aktiviert werden.

Tabelle 16 UAS-Effektorstämme

Bezeichnung	Chromosomale Insertion	Kurze Beschreibung/Merkmale	Referenz
UAS- <i>d-arf6</i> [Q67L]	2, 3	Konstitutiv GTP-gebundenes D-Arf6	Chen et al., 2003
UAS- <i>d-arf1</i> [Q71L]	3	Konstitutiv GTP-gebundenes D-Arf1	S.Önel
UAS- <i>d-arf1</i> [Q71L], <i>schizo</i> ^{C1-28}	3	Konstitutiv GTP-gebundenes im <i>schizo</i> ^{C1-28} mutanten Hintergrund	S.Önel
UAS- <i>d-arf1</i> [T31N]-Flag	2	Konstitutiv GDP-gebundenes D-Arf1	S.Önel
UAS- <i>rac1</i> [G12V]	3	Konstitutiv aktives Rac1	BL6291
UAS- <i>rac1</i> -myc	X	Wildtypisches Rac1 mit 10xmyc	BL6680
UAS- <i>scar</i>	2	Wildtypisches Scar	S.Önel

5.1.15.7. RNAi Linien

RNAi-Konstrukte unter Kontrollen von UAS-regulatorischen Elementen (Dietzl et al., 2007) wurden von dem Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC) bezogen.

Tabelle 17 RNAi Linien

Bezeichnung	Genotyp	Ziel-Gen	Chromosomale Insertion
GD 23082	Arf79F[GD12522]	<i>arf79F = d-arf1</i>	3. Chr.
GD 24224	Arf51F[GD13822]	<i>arf51F = d-arf6</i>	3. Chr.
GD 24678	RhoGap15B[GD11479]	<i>rhoGAP15B (CG4937)</i>	2. Chr.
GD 24679	RhoGap15B[GD11479]	<i>rhoGAP15B (CG4937)</i>	3. Chr.

5.1.15.8. Sonstige Fliegenstämme

Tabelle 18 Sonstige Fliegenstämme

Bezeichnung	Chromosomale Insertion	Kurze Beschreibung/Merkmale	Referenz
<i>w⁻</i>	-	Transformationsstamm, Laborzucht der AG Renkawitz-Pohl	
$\Delta 2-3$	3	Aktive P-Element Transposase im pBac-Vektor y[1] w[1118]; pBac{Delta2-3.Exel}196 Deletion des 2. und 3. Exons ($\Delta 2-3$) des Transposase-Gens führt zur konstitutiven Aktivierung der sonst nur in der Keimbahn aktiven Transposase	Exelixis Inc. BL8200
$\phi X-86Fb$ (J5)	X., 3.	y w M (eGFP.vas-int.Dm)ZH-2A ; M(RFP.attP)ZH-86F Keimbahnspezifische Expression der $\phi 31$ -Integrase; attP-Landungsstelle an cytologischer Position 86F (3R).	Bischof et al., 2007 BL24729

5.2. Arbeiten mit dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

5.2.1. Haltung von Fliegenstämmen

Die Stammhaltung von *Drosophila melanogaster* erfolgt in Klimakammern bei 18°C oder 25°C auf Maismehlagarflaschen unterschiedlicher Größe (26 mm, 36 mm oder 50 mm). Das Umsetzen der Fliegen auf frische Maismehlagarflaschen findet bei 18°C alle drei Wochen statt, während das Umsetzen bei Haltung auf 25°C alle zwei Wochen erfolgt. Die Betäubung der Fliegen erfolgt entweder mit CO₂ oder mit Diethylether.

Maismehlagar-Brei	60 % (w/v) Maismehl
	7,15 % (w/v) Fructose
	1,2 % (w/v) Trockenhefe
	0,14 % (v/v) Nipagin
	0,6 % (v/v) Propionsäure
	2,7 % (w/v) Agar

5.2.2. Embryonenablagen

Die Fliegen werden auf Traubensaftflaschen bzw. Apfelsaftschälchen gesetzt und bei 18°C oder 25°C zweimal täglich (morgens und abends) auf frische Flaschen bzw. Schälchen umgesetzt. Je nach benötigtem Stadium werden die abgelegten Embryonen bei 18°C oder 25°C nachgealtert. Die Fixierung der Embryonen erfolgt nach spätestens drei Tagen.

Trauben- oder Apfelsaftsflaschen	25 % (w/v) Apfel- oder Traubensaft
	1,25 % (w/v) Saccharose
	2,5 % (w/v) Trockenhefe
	0,2 % (v/v) Nipagin
	2,7 % (w/v) Agar

5.2.3. P-Element Keimbahntransformation durch Mikroinjektion

(Rubin and Spradling, 1982; Groth et al., 2004; Bischof et al., 2007)

P-Transposase und $\phi C31$ -Integrase vermittelte Integration von P-Elementen

Die Transposase erkennt die terminalen Sequenzen eines P-Elements und bewirkt über die intrinsische Endonuklease-Aktivität eine GTP-abhängige Integration des P-Elements durch einen „Cut und Paste“-Mechanismus (Beall and Rio, 1997). Eine effiziente Transposition benötigt mindestens 150 bp der terminalen Sequenzen inklusive der für P-Elemente charakteristischen invertierten Sequenzwiederholungen und P-Transposase-Bindestellen. Im Falle der P-Transposase vermittelten Integration von P-Elementen wird zusätzlich ein sogenannter Helferplasmid (p $\pi 25.7wc$) ko-injiziert, welcher für die notwendige Transposase kodiert. Aufgrund

fehlender regulatorischen Regionen und Transposase-Bindestellen kann das Helferplasmid selbst nicht in das Genom integrieren und geht verloren. Die Injektion der DNA erfolgt in *white*⁻ Embryonen.

Im Falle der ϕ C31-Integrase vermittelten Integration von P-Elementen in das *Drosophila* Genom ist kein Helferplasmid notwendig. Die Injektion der DNA erfolgt in spezielle *white* Fliegenstämme, die keimbahnspezifisch die ϕ C31-Integrase exprimieren (Bischof et al., 2007). Die ϕ C31-Integrase kodiert für eine Serin-Integrase, die die Sequenz-gerichtete Rekombination zwischen einer bakteriellen Anheftungsstelle (attachment site *attB*) und einer Phagen Anheftungsstelle (attachment site *attP*) vermittelt (Abb. 44, Thorpe 2000). Zusätzlich zu der endogenen ϕ C31-Integrase Quelle besitzen diese Fliegenstämme lokalisierte und bestens charakterisierte, vordefinierte Landungsstellen. Diese Landungsstellen beinhalten die *attP*-Sequenzen, welche als Kopplungsstelle für *attB*-tragende P-Elemente dienen (Bischof et al., 2007).

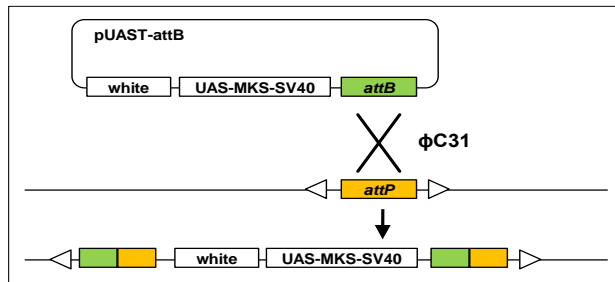


Abb. 44 ϕ C31-Integrase vermittelte Integration eines pUAS-attB in attP-Zielstellen

Der Transformationsvektor pUAS-attB beinhaltet ein attB-Fragment, einen *white*⁺ Selektionsmarker und die Multiple-Klonierungsstelle (MKS) flankiert durch UAS-regulatorische Elemente und einem SV40-Terminationssignal. Die ϕ C31-Integrase vermittelte Rekombination zwischen der attB-Stelle im injizierten Plasmid und der im Genom lokalisierten attP-Stelle bewirkt eine chromosomale Integration des pUAS-attB in die definierten Landungsstellen. Die Rekombination erzeugt dabei artifizielle attR und attL-Stellen, die nicht mehr durch die ϕ C31-Integrase erkannt werden und somit ein Herausspringen des pUAS-attB verhindern. (UAS Upstream aktivierende Sequenzen)

Vorbereitung der Embryonen für die Mikroinjektion

Bei der Mikroinjektion wird das Plasmid mit dem zu untersuchendem Gen in den posterioren Bereich eines Embryos im Blastodermstadium injiziert, in dem die Polzellen gebildet werden.

Zur Vorbereitung der Mikroinjektion werden die Fliegen zunächst für 3 bis 4 Tage auf Ablage gesetzt. Am Tag der Mikroinjektion werden die Ablagen morgens zunächst jede Stunde gewechselt, um das Stadium der Embryonen zu synchronisieren. Danach werden die Eier abgewaschen, gesammelt und in einem 1:1-Gemisch von Klorix und A.dest dechorionisiert. Die dechorionisierten Embryonen werden gründlich mit PBT gewaschen und auf einem Apfelsaftagarblock aufgereiht. Dabei sollte das posteriore Ende immer in die gleiche Richtung zeigen. Auf die ausgerichteten Embryonen wird vorsichtig ein mit Heptan-Klebstoff-Gemisch beschichteter Objektträger gelegt. Die Embryonen bleiben auf dem Objektträger kleben und werden für 10 min im Exikator über Kieselgel getrocknet, um den Innendruck der Embryonen für die nachfolgende Injektion zu senken. Um die Embryonen vor weiterer Austrocknung zu schützen, werden sie mit Voltalef-Öl überschichtet.

Mikroinjektion

Die Injektion der DNA am posterioren Pol erfolgt mit einer Glaskapillare (Ø1,2mm), die in einem Kapillarzyehgerät manuell ausgezogen wurden. Die Injektionsnadel wird anschließend mit dem Injektionsansatz befüllt.

10x Injektionspuffer	1 mM NaHPO ₄ 50 mM KCl
Injektionsansatz	0,2 µg/µL Plasmid-DNA
P-Transposase vermittelt	0,2 Helferplasmid pπ25.7wc 1 x Injektionspuffer
Injektionsansatz	0,2 µg/µL Plasmid-DNA
ϕC31-Integrase vermittelt	1 x Injektionspuffer

Vor der Injektion wird der Injektionsansatz zentrifugiert (13.000 rpm, mind. 30 min, 4°C), um störende Teil zu sedimentieren und ein Verstopfen der Nadel zu verhindern. Die mit dem Injektionsansatz gefüllte Nadel wird in die Mikroinjektionsapparatur, die mit einer Druckapparatur verbunden ist, eingespannt und befestigt. Eine Öffnung der Kapillare wird durch vorsichtiges Abbrechen der Spitze am Rand des Deckgläschen erreicht. Anschließend wird die Spitze der Kapillare vorsichtig in den posterioren Pol eines Blastoderm-Stadium-Embryos eingeführt und durch gleichmäßigen vorhandenem Druck die DNA-Lösung in die Keimzellen des Embryos injiziert. Embryonen, bei denen schon die Polzellen erkennbar waren, wurden durch seitliches Aufreißen mit der Injektionsnadel abgetötet, da für diese keine Keimbahntransformation mehr möglich ist. Nach erfolgter Injektion werden die Embryonen erneut mit Voltalef-Öl überschichtet, in eine feuchte Petri-Schale mit Apfelsaftagar überführt und bei 25 °C bis zum Schlüpfen der Larven inkubiert. Die geschlüpften Larven werden vorsichtig mit Hilfe einer Präpariernadel in Maismehlagarflaschen überführt und bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen bei 25°C inkubiert.

Selektion transgener Fliegenstämme und Bestimmung des Lokalisationsortes

Da die Injektion des P-Elements in die Keimbahn erfolgt, ist eine erfolgreiche Insertion des P-Elements erst in der F₁-Generation erkennbar. 24 Stunden nach der Injektion werden die geschlüpften Larven (Parentalgeneration) vorsichtig auf Hefebreifflaschen überführt und die daraus resultierenden Fliegen gegen *white*-Fliegen gekreuzt. Da die verwendeten Plasmide ein *white*-Gen enthalten, ist eine erfolgreiche Integration an der gelben bis roten Augenfarbe in den Fliegen der F₁-Generation erkennbar. Die Intensität der Augenfarbe hängt dabei vom Integrationsort des Plasmids im Genom ab. Die erhaltenen transgenen Fliegen werden erneut gegen *white*-Fliegen gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzung werden nun zweimal gegen einen Doppelbalancer-Stamm gekreuzt, um einerseits einen stabilen transgenen Stamm zu etablieren und andererseits den chromosomalen Integrationsort des P-Elements zu bestimmen. Da bei der ϕ C31-Integrase vermittelten Integration die Lokalisation des P-Elements vorherbestimmt ist, kann direkt gegen entsprechende Marker oder Balancer-Stämme gekreuzt werden.

Tabelle 19 Generierte transgene Fliegenstämme

Bezeichnung	Chromosomale Insertion			Kurze Beschreibung/Merkmale
	X.	2.	3	
UAS- <i>d-arf2</i> [Q71L]	2	2	7	Konstitutiv GTP-gebundenes D-Arf2
UAS- <i>d-arf2</i> [Q71L]- <i>EGFP</i>	--	--	3R-86F 2	Konstitutiv GTP-gebundenes D-Arf2. Am C-Terminus fusioniert mit EGFP
UAS- <i>d-arf2</i> [T31N]- <i>EGFP</i>	--	--	3R-86F 3	Konstitutiv GDP-gebundenes D-Arf2. Am C-Terminus fusioniert mit EGFP
UAS- <i>d-arf6</i> [T27N]	1	2	2	Konstitutiv GDP-gebundenes D-Arf1
UAS- <i>d-git-fl-Flag</i>	---	3	3	Wildtypisches D-Git mit C-terminalen FLAG-Tag
UAS- <i>HA-d-git-fl</i>		2	1	Wildtypisches D-Git mit C-terminalen HA-Tag
UAS- <i>d-gitΔGAP</i>	1	2	3	D-Git mit deletierter Arf-GAP-Domäne
UAS- <i>d-gitΔANK-FLAG</i>	--	1	1	D-Git mit deletierten Ankyrin-Wiederholungen und C-terminalen FLAG-Tag
UAS- <i>d-gitΔSHD-FLAG</i>	--	2	4	D-Git mit deletierter Spa-Homologie-Domäne (SHD) und C-terminalen FLAG-Tag
UAS- <i>d-gitΔPBS-FLAG</i>	--	3	5	D-Git mit deletierter Paxillin-Bindestelle (PBS) und C-terminalen FLAG-Tag
UAS- <i>d-gitGAP-GFP</i>	---	2	2	GAP-Domäne von D-Git mit C-terminalen GFP

5.2.4. Umbalancieren und Mehrfachmarkierung von Chromosomen

Für die Analyse von embryonal letalen Mutanten ist die Unterscheidung von homozygot und heterozygot mutanten Embryonen unabdingbar und setzt somit das Vorhandensein von Balancer-Chromosomen mit Reporterplasmiden auf dem nicht mutanten Chromosom voraus. Der Austausch von verschiedenen Marker- und Balancer-Chromosomen wird Umbalancieren genannt. Abb. 45 gibt ein Kreuzungsschema für eine typische Umbalancierungs-Kreuzung wieder.

$$\begin{array}{l} \text{♀ } \frac{\text{Mutante}}{\text{Bal A}} \times \frac{\text{Mar}}{\text{Bal B}} \text{ ♂} \\ \\ \frac{\text{Mutante}}{\text{Bal B}} \text{ ♀♀ und } \frac{\text{Mar}}{\text{Bal B}} \text{ ♂♂ (Etablierungskreuzung)} \end{array}$$

Abb. 45 Umbalancierungs-Kreuzung

Kreuzungsschema zum „Austausch“ von Balancer-chromosomen. Abkürzungen: ♀ Jungfräuliche Fliegen, ♂ männliche Fliegen, Bal A/B Balancer-Chromosom A oder B, Mar Marker-Chromosom

Für die Herstellung von Doppelmutanten ist es zudem notwendig, das jeweilige andere Chromosom zu markieren. Das folgende Kreuzungsschema Abb. 46 zeigt beispielhaft eine sogenannte Mehrfachmarkierungskreuzung.

$$\begin{array}{l} \text{♀ } \frac{\text{Mutante}}{\text{Bal A}}; \frac{+}{+} \times \frac{\text{Mar A}}{\text{Bal B}}; \frac{\text{Mar B}}{\text{Bal C}} \text{ ♂} \\ \\ \text{♀ } \frac{\text{Mutante}}{\text{Bal B}}; \frac{+}{\text{Mar B}} \times \frac{\text{Mutante}}{\text{Bal B}}; \frac{+}{\text{Bal C}} \text{ ♂} \\ \\ \frac{\text{Mutante}}{\text{Bal B}}; \frac{\text{Mar B}}{\text{Bal C}} \text{ ♀♀ und } \frac{\text{Mutante}}{\text{Bal B}}; \frac{\text{Mar B}}{\text{Bal C}} \text{ ♂♂ (Etablierungskreuzung)} \end{array}$$

Abb. 46 Kreuzungsschema Mehrfachmarkierung von Chromosomen

Abkürzungen: ♀ Jungfräuliche Fliegen, ♂ männliche Fliegen, Bal A/B/C Balancer-Chromosom A, B oder C, Mar A/B Marker-Chromosom oder B

5.2.5. Herstellung von Doppelmutanten

Das kreuzungsgenetische Verfahren zur Herstellung von Doppelmutanten oder äquivalent zum Einbringen einer P-Element-Insertion in mutanten Hintergrund ist in Abb. 47 dargestellt.

$$\begin{array}{l} \text{♀ } \frac{\text{Mut A}}{\text{Bal A}}; \frac{\text{Bal B}}{\text{Bal C}} \times \frac{\text{Bal D}}{\text{Bal A}}; \frac{\text{Mut B}}{\text{Bal C}} \text{ ♂} \\ \\ \frac{\text{Mut A}}{\text{Bal A}}; \frac{\text{Mut B}}{\text{Bal C}} \text{ ♀♀ und } \frac{\text{Mut A}}{\text{Bal A}}; \frac{\text{Mut B}}{\text{Bal C}} \text{ ♂♂ (Etablierungskreuzung)} \end{array}$$

Abb. 47 Kreuzungsschema Doppelmutanten

Abkürzungen: ♀ Jungfräuliche Fliegen, ♂ männliche Fliegen, Bal A/B/C Balancer-Chromosom A, B oder C, Mut A/B Mutante oder B

Tabelle 20 Generierte Doppelmutanten bzw. P-Elemente und Mutanten

Bezeichnung	Verifikation
UAS-HA <i>schizo</i> 2; <i>schizo</i> ^{C1-28} /T <i>Dl</i> z, <i>Sb</i>	- Nachweis UAS-HA <i>schizo</i> in <i>wg</i> -Domäne - Letalitätstestkreuzung <i>schizo</i> ^{U112}
UAS-V5 <i>schizo</i> 2; <i>schizo</i> ^{C1-28} /T <i>Dl</i> z, <i>Sb</i>	- Letalitätstestkreuzung <i>schizo</i> ^{U112}
UAS- <i>d-arf6-Q67L</i> ; <i>schizo</i> ^{C1-28} /T <i>Dl</i> z, <i>Sb</i>	- Nachweis UAS- <i>d-arf6-Q71L</i> in <i>wg</i> -Domäne - Letalitätstestkreuzung <i>schizo</i> ^{U112}
UAS- <i>rac1myc</i> ; <i>schizo</i> ^{C1-28} /T <i>Dl</i> z, <i>Sb</i>	- Nachweis UAS- <i>rac1myc</i> in <i>wg</i> -Domäne - Letalitätstestkreuzung <i>schizo</i> ^{U112}
<i>d-arf6</i> ¹ /Cyohg-LacZ; <i>schizo</i> ^{C1-28} /T <i>Dl</i> z, <i>Sb</i>	- Nachweis <i>d-arf6</i> Deletion mit PCR (Arf6-5UTR-for2 Arf6-3UTR-rev) - Letalitätstestkreuzung <i>schizo</i> ^{U112}
<i>d-arf6</i> ¹ /Cyohg-LacZ; <i>Df(3L)ED5017/TM2^{bb}</i>	- Nachweis <i>d-arf6</i> Deletion mit PCR (Arf6-5UTR-for2 Arf6-3UTR-rev) - Letalitätstestkreuzung <i>Df(3L)ED5017</i> und <i>Arf79</i> ^{C005}
UAS- <i>d-arf1-T31N</i> ; UAS- <i>d-arf6-T27N</i> UAS- <i>d-arf1-RNAi</i> ; UAS- <i>d-arf6-RNAi</i> <i>scar</i> ^{k13111} /Cyohg-LacZ; <i>schizo</i> ^{C1-28} /TM2 ^{bb}	- Letalitätstestkreuzung <i>schizo</i> ^{U112} - Letalitätstestkreuzung <i>scar</i> Defizienz
<i>sns4,5-Gal4</i> ; <i>schizo</i> ^{C1-28} /T <i>Dl</i> z, <i>Sb</i>	- Letalitätstestkreuzung <i>schizo</i> ^{U112} - <i>sns4,5-Gal4</i> >>UAS-GFP
TGX <i>twi-Gal4</i> ; <i>rac1</i> ^{J11} /T <i>Dl</i> z, <i>Sb</i>	- Nachweis <i>rac1</i> ^{J11} mit PCR (<i>rac1</i> -seq-for und seq-rev) und Sequenzierung
TGX <i>twi-Gal4</i> ; <i>arf6</i> ¹ /Cyohg-LacZ	- Nachweis <i>d-arf6</i> Deletion mit PCR (Arf6-5UTR-for2 Arf6-3UTR-rev)
TGX <i>twi-Gal4</i> ; <i>Df(3L)ED5017/TDl</i> z, <i>Sb</i>	- Letalitätstestkreuzung <i>Df(3L)ED5017</i> und <i>Arf79</i> ^{C005}
TGX <i>twi-Gal4</i> ; <i>scar</i> ^{k13111} /Cyohg-LacZ	- Letalitätstestkreuzung <i>scar</i> Defizienz
<i>scar</i> ^{k13111} /Cyohg-LacZ; <i>mef2-Gal4</i>	- Überexpression UAS- <i>rac1</i> [G12V] im Mesoderm
<i>scar</i> ^{k13111} /Cyohg-LacZ; UAS- <i>rac1</i> [G12V]	
<i>scar</i> ^{k13111} /Cyohg-LacZ; <i>rac1</i> ^{J11} /TM2 ^{bb}	- Letalitätstestkreuzung <i>d-git</i> ^{Aa} - Letalitätstestkreuzung <i>Df(3L)ED5017</i> und <i>Arf79</i> ^{C005}
<i>d-git</i> ^{Aa} /Cyohg-LacZ; <i>Df(3L)ED5017/TDl</i> z, <i>Sb</i>	- Letalitätstestkreuzung <i>d-git</i> ^{Aa} - Letalitätstestkreuzung <i>Df(3L)ED5017</i> und <i>Arf79</i> ^{C005}
UAS- <i>d-git</i> (versch. Konstrukte); 24 <i>B-Gal4</i>	- Nachweis der D-Git-Konstrukte im Mesoderm
sg24-Gal4; UAS- <i>d-git</i> (versch. Konstrukte)	- Nachweis der D-Git-Konstrukte im Mesoderm
rP298-LacZ; UAS- <i>d-arf1-Q71L/MKRS</i>	- Überexpression im Mesoderm

5.2.6. Meiotische Rekombination oder Herstellung von Rekombinanten

Meiotische Rekombination wird in *Drosophila* eingesetzt, um zwei Mutationen (oder P-Element und Mutation) auf ein Chromosom zu rekombinieren. Crossover zwischen zwei Chromosomen tritt in *Drosophila* jedoch nur in weiblichen Tieren auf, da in männlichen Tieren der Synaptomale Komplex nicht ausgebildet wird. Daher werden Jungfrauen benötigt, die Doppel-heterozygot für die zu rekombinierenden Merkmale sind (Abb. 48). Putativ rekombinante Fliegen unter den Nachkommen werden hinsichtlich der Anwesenheit beider Merkmale getestet, was im Falle von homozygot letalen Einzel-Mutationen durch Letalitäts-Testkreuzungen und im Falle von nicht letalen Mutationen durch PCR-Analysen und gegebenenfalls Sequenzierung der entsprechenden Regionen identifiziert. Die Anzahl der Einzelpaarkreuzungen richtet sich nach der cytologischen Lokalisation der Gene oder P-Elemente auf dem Chromosom. Dabei entsprechen 5 Einheiten einer Rekombinationsfrequenz von 5%.

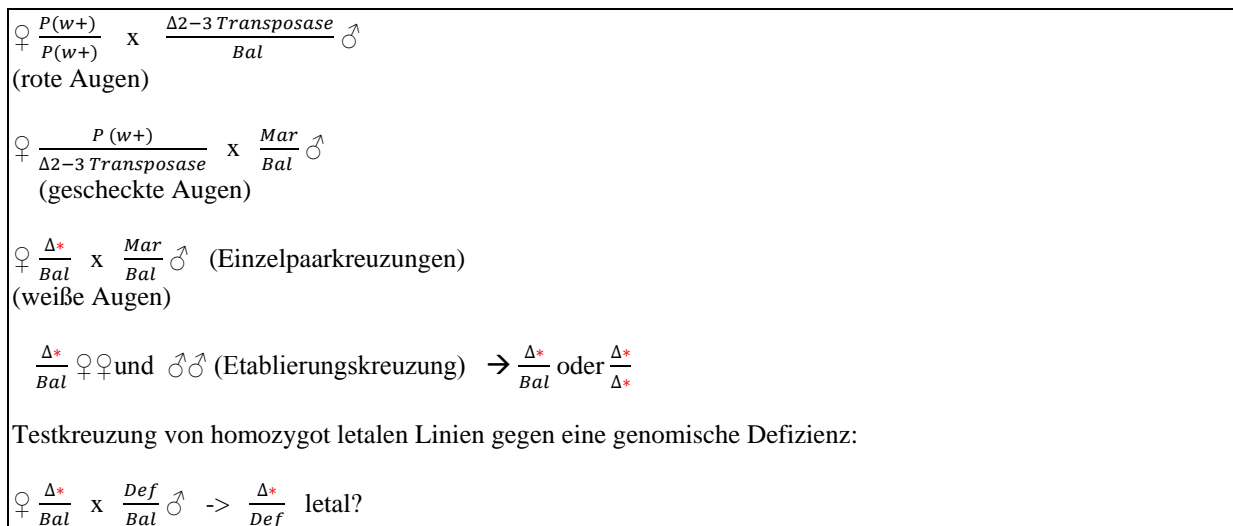
♀ $\frac{M\ 1}{Bal}$ x $\frac{M\ 2}{Bal}$ ♂
♀!! $\frac{M1 +}{+ M2}$ x $\frac{Mar}{Bal}$ ♂ (in ♀ findet Rekombinationsereignis statt)
♀ $\frac{M\ 1, M\ 2 *}{Bal}$ x $\frac{Mar}{Bal}$ ♂ (Einzelpaarkreuzungen!)
$\frac{M\ 1, M\ 2 *}{Bal}$ ♀♀ und ♂♂ (Etablierungskreuzung)

Abb. 48 Kreuzungsschema zu Herstellung von rekombinanten Fliegenlinien

Die zu rekombinierenden Merkmale müssen zunächst in eine transheterozygote Situation gebracht werden, um ein Crossover in den Gameten der Weibchen zu ermöglichen. Jungfräuliche, transheterozygote Fliegen werden gegen Balancer-Tiere gekreuzt. Nachkommen dieser Kreuzung werden in Einzelpaarkreuzungen erneut gegen Balancer-Tiere gekreuzt, um anschließend individuelle Linien zu etablieren. Abkürzungen: ♀ Jungfräuliche Fliegen, ♂ männliche Fliegen, * mögliches Rekombinationsereignis, Bal Balancer-Chromosom, M Merkmal (Mutation oder P-Element-Insertion), Mar Marker-Chromosom

Tabelle 21 In dieser Arbeit hergestellten Rekombinanten

Mutante 1 oder P-Element Insertion	Mutante 2 oder P-Element Insertion	Rekombinante Fliegenlinie	V erifiziert durch
<i>d-git</i> ^{Δa}	<i>P{EP}Arf51F</i> ^{EP2612}	<i>d-git</i> ^{Δa} , <i>P{EP}Arf51F</i> ^{EP2612} *ohne letalen Hit vom EP2612 Chromosom	- Letalitätstestkreuzung <i>d-git</i> ^{Δa} - Nachweis P-Element mit PCR
<i>d-git</i> ^{Δa}	<i>d-arf6</i> ^l	<i>d-git</i> ^{Δa} , <i>arf6</i> ^l	- Letalitätstestkreuzung <i>d-git</i> ^{Δa} - Nachweis der <i>d-arf6</i> Deletion mit PCR (<i>Arf6</i> -5UTR-for2 <i>Arf6</i> -3UTR-rev)
<i>d-git</i> ^{Δa}	<i>paxillin</i> ^{f03922}	<i>paxillin</i> ^{f03922} , <i>d-git</i> ^{Δa}	- Letalitätstestkreuzung <i>d-git</i> ^{Δa} - Nachweis P-Element mit PCR
<i>d-git</i> ^{Δa}	<i>paxillin</i> ^{c06996}	<i>paxillin</i> ^{c06996} , <i>d-git</i> ^{Δa}	- Letalitätstestkreuzung <i>d-git</i> ^{Δa} - Nachweis P-Element mit PCR
<i>d-git</i> ^{Δa}	<i>Df(2L)ED1231</i> (<i>pax Df</i>)	<i>Df(2L)ED1231</i> , <i>d-git</i> ^{Δa} ,	- Letalitätstestkreuzung <i>d-git</i> ^{Δa} - Letalitätstestkreuzung BL3785
<i>schizo</i> ^{C1-28}	<i>rac1</i> ^{J11} <i>FRT80A</i>	<i>rac1</i> ^{J11} , <i>FRT80A</i> , <i>e</i> , <i>schizo</i> ^{C1-28}	-Letalitätstestkreuzung <i>schizo</i> ^{U112} - Nachweis G60E Austausch mit Primern <i>rac</i> -seq-for und <i>rac</i> -seq-rev un Sequenz.
<i>schizo</i> ^{C1-28}	<i>P{EPgy2}rac1</i> ^{EY05848}	<i>rac1</i> ^{EY05848} , <i>schizo</i> ^{C1-28}	-Letalitätstestkreuzung <i>schizo</i> ^{U112} - Nachweis P-Element mit PCR
<i>schizo</i> ^{C1-28}	<i>UAS-rac</i> ^{G12V}	<i>schizo</i> ^{C1-28} , <i>UAS-rac</i> ^{G12V}	- Letalitätstestkreuzung <i>schizo</i> ^{U112} -Nachweis UAS-konstrukt in wg Domäne
<i>schizo</i> ^{C1-28}	<i>wasp</i> ^{3D3-035}	<i>schizo</i> ^{C1-28} , <i>wasp</i> ^{3D3-035} <i>e</i>	-Letalitätstestkreuzung <i>schizo</i> ^{U112} -Letalitätstestkreuzung <i>wasp</i> ³

**Abb. 49 Kreuzungsschema zur Herstellung einer Deletion durch unpräzise P-Element Exzision**

Zunächst wird eine aktive Transposase ($\Delta 2-3$) in P-Element tragende Fliegen (*white*+, rote Augen) eingekreuzt. Das zellautonome Herausspringen des P-Elements kann an der gescheckten Augenfarbe dieser Fliegen verfolgt werden. Folgend werden unabhängige Stämme von weißäugigen Revertanten etabliert und durch Letalitätstest analysiert. Abkürzungen: ♀ Jungfräuliche Fliegen, ♂ männliche Fliegen, Δ^* Exzisionsereignis, Bal Balancer-Chromosom, Mar Marker-Chromosom, $P(w+)$ P-Element mit *white* als dominanten Marker

5.2.7. P-Element Exzisionsmutagenese

Eine Möglichkeit zur Herstellung von Deletionsmutanten in *Drosophila melanogaster* bietet die Exzisionsmutagenese. Die Transposase induzierte Exzision eines P-Elements erzeugt einen Doppelstrangbruch in der DNA. Mögliche Degradation der Doppelstrang-Enden vor Religation kann zu einer Deletion flankierender genomischer Region führen, was als unpräzise Exzision bezeichnet wird. Unpräzise Exzisionsereignisse erfolgen mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 1%. Der deletierte Bereich kann zwischen wenigen Basen bis zu mehreren kB variieren und findet unabhängig am 3' oder am 5' Ende eines P-Elements statt. Unabhängige Exzisionsereignisse werden auf der Grundlage des Verlustes eines dominanten Markers des P-Elements selektioniert, wie z. B. der Verlust der roten Augenfarbe. In der Regel werden mindestens 300 unabhängige Linien mit Exzisionsereignissen etabliert (Abb. 49). Letalitätstest mit einer bereits charakterisierten genomischen

Defizienz grenzen bei Letalität die erzeugte Deletion auf eine genomische Region ein. Die molekulare Analyse der Veränderungen der genomischen Sequenz erfolgt durch PCR-Analysen oder Southern-Blot.

In dieser Arbeit wurde die P-Element Exzisionsmutagenese für das *Drosophila arf1* Gen, sowie für *Drosophila git* (in Zusammenarbeit mit E. Klaus) durchgeführt. Dazu wurden die P-Elemente $P\{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2\}Arf79F[EY08473]$ bzw. $P\{w[+mC] y[+mDint2]=EPgy2\}CG16728[EY09254]$ benutzt, die beide in der 5'UTR der Gene lokalisiert sind und ein *white*-Gen als dominanten Marker tragen. Die erzeugten Exzisionsmutanten sind begründet durch den Verlust des *white* Gens durch eine weiße Augenfarbe gekennzeichnet.

5.2.8. Ektopische Expression durch das UAS/Gal4-System

(Brand and Perrimon, 1993)

Zur ektopischen Expression von Genen werden sogenannte Gal4-Treiberlinien mit sogenannten UAS-Effektorlinien (UAS = upstream activating sequence) gekreuzt. In den Treiberlinien wird der Transkriptionsaktivator Gal4 unter der Kontrolle eines bestimmten genomischen Enhancers exprimiert. In den Nachkommen der Kreuzungen bindet der Transkriptionsaktivator Gal4 an die UAS-Bindestelle und aktiviert die Expression des downstream liegendem Gens in einem Treiber-spezifischen Expressionsmuster. Die Kreuzungen werden auf Traubensaftflaschen bzw. Apfelsaftschälchen zur Ablage gebracht und hinsichtlich des Expressionsmusters und Phänotyps untersucht.

5.2.9. Sterilitätstests

Für die Bestimmung der Fertilität wurden in Einzelpaarkreuzungen homozygote männliche oder jungfräuliche weibliche *d-gitΔa* Fliegen mit drei *white* Fliegen des jeweils anderen Geschlechtes gekreuzt. Als Kontrolle wurden parallel dazu einzelne *white* Männchen oder Weibchen in gleicher Weise hinsichtlich der Sterilität geprüft. Alle Einzelpaarkreuzungen wurden bei 25°C inkubiert und die Anzahl der Nachkommen nach zwei Wochen bestimmt.

5.2.10. Bestimmung der Letalität für die einzelnen Entwicklungsstadien

Mutanten werden in Transheterozygose zu einem GFP-Balancer etabliert, in dem GFP in einem spezifischen Muster im Embryo exprimiert wird (z. B. *twi*-Gal4). Nicht GFP-exprimierende und damit homozygote Embryonen der Stadien 12-16 werden auf eine Apfelsaft-Agarschälchen transferiert und bei 25°C inkubiert. Dabei ist zu beachten, dass die Embryonen bzw. Larven nicht austrocknen. Innerhalb der nächsten 10-14 Tagen wird die fortschreitende Entwicklung der Individuen beobachtet und die Zahl der Überlebenden bzw. Verstorbenen notiert. Wildtyp Fliegen werden als Vergleich parallel eingesetzt.

5.3. Histologische Methoden

5.3.1. Formaldehyd-Fixierung von *Drosophila*-Embryonen

Die Embryonen werden mit Hilfe eines Pinsels und PBT von den Traubensaftflaschen bzw. Apfelsaftschälchen in ein Netzchen überführt und darin mehrmals mit PBT gewaschen. Um die Embryonen zu dechorionisieren werden diese für 5 min mit einem 1:1-Gemisch aus Klorix und A.dest umspült. Der Verlauf der Dechorionisierung kann dabei unter einem Binokular verfolgt werden. Anschließend werden die Embryonen zweimal in A.dest gewaschen. Die in dem Netzchen befindlichen Embryonen werden auf einem Zellstofftuch trocken geblottet, um den Wechsel in die organische Heptanphase zu gewährleisten. Die Embryonen werden nun in Heptan in ein Eppendorf-Gefäß transferiert. Auf die Embryonen werden 0,5 mL Heptan und 0,5 mL 4% Formaldehyd-PBS (F-PBS) gegeben und der Ansatz für 15 min bei RT geschüttelt. Die Fixierung der Embryonen erfolgt dabei an der Heptan/F-PBS-Phasengrenze. Nach der erfolgten Fixierung wird zuerst die untere, wässrige Phase vollständig entfernt, anschließend die obere, organische Phase. Die Embryonen werden zweimal in 1 mL Heptan gewaschen. Das Heptan wird vollständig abgenommen und 0,5 mL frisches Heptan

sowie 0,5 mL MeOH dazugegeben. Der Ansatz wird für 40 sek kräftig geschüttelt, um die Vitellinmembran zu entfernen. Sowohl die obere Heptanphase als auch die untere MeOH-Phase werden nun abgezogen. Die fixierten, devitellinisierten Embryonen sinken ab, während nicht devitellinisierte oder zu alte Embryonen in der Heptan/MeOH-Phasengrenze schweben und mit abgenommen werden können. Die dechorionisierten, fixierten und devitellinisierten Embryonen werden noch zweimal mit 1mL MeOH gewaschen.

Die Lagerung der Embryonen erfolgt in MeOH bei 4°C oder bei -20°C.

4 % Paraformaldehyd/PBS (4 % F-PBS)

1 x PBS

4 % Formaldehyd

Lösen des Formaldehyds erfolgt bei 60°C.

Lagerung bei 4°C.

5.3.2. Hitzefixierung

Das Sammeln und das Dechorionisieren erfolgt wie bei der Formaldehyd-Fixierung der Embryonen. Anschließend wird in ein kleines Glasgefäß gefülltes PBS im Wasserbad bis auf 97°C erhitzt. Die Embryonen werden im Netzchen befindlich für 10 bis 40 sek in dem erhitzten PBS inkubiert und anschließend in kalten PBS abgekühlt. Nach dem Trocken-Blotten auf einem Zellstofftuch werden die Embryonen in Heptan überführt. Im Anschluss erfolgt die Devitellinisierung und die folgenden Waschschrte wie bei der F-PBS-Fixierung.

5.3.3. *whole mount*-Antikörperfärbungen an *Drosophila* Embryonen

Das MeOH wird von den Embryonen abgenommen und die Embryonen werden einmal kurz und zweimal für 10 min in 1 mL PBT gewaschen, um eine Rehydrierung der Embryonen zu erreichen. Der primäre Antikörper wird in PBT verdünnt auf die Embryonen gegeben und ü. N. bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der ü. N. inkubierte primäre Antikörper wird abgenommen und bei Bedarf aufgehoben. Die Embryonen werden einmal kurz und zweimal für 20 min unter Schütteln in PBT gewaschen. Um unspezifisches Binden des sekundären Antikörpers zu blocken, werden die Embryonen für 30 min unter Schütteln mit 0,5 mL 2 % Ziegen Serum (ZS)/PBT inkubiert. Nach dem Blocken wird der Überstand verworfen und der sekundäre Antikörper in der entsprechenden Verdünnung auf die Embryonen gegeben und für 2 h schüttelnd bei RT inkubiert.

a) Färbungen mit sekundären biotinyliertem Antikörper

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wird der biotinylierte sekundäre Antikörper zuvor an wildtypischen Embryonen vorinkubiert. Dazu werden diese dreimal für 10 min in PBT rehydriert und anschließend der sekundäre Antikörper in einer 1:20 Verdünnung in 2 % ZS/PBT für 30 min auf den Embryonen inkubiert. Von dieser vorinkubierten Stocklösung werden pro sekundärer Antikörperinkubation 20 µL in 380 µL PBT verdünnt. Daraus resultiert für den biotinylierten sekundären Antikörper eine 1:400 Verdünnung. Nach der Inkubationszeit wird der sekundäre Antikörper abgenommen und die Embryonen dreimal für 10 min in 1 mL PBT gewaschen.

Die Antikörperfärbung wird mit dem Vectastain Elite ABC Kit der Firma Vector Laboratories durchgeführt. Der sekundäre, biotinylierte Antikörper wird spezifisch von dem Avidin-Peroxidase Komplex gebunden. Der Avidin-Teil bindet an das Biotin, während die Peroxidase die Reduktion von H₂O₂ katalysiert, welche wiederum die Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB) auslöst. Die Oxidation von DAB ist an einer Braunfärbung zu erkennen. Durch Zugabe von Nickelchlorid kann eine Schwarzfärbung erreicht werden.

Der AB-Komplex wird während der 30 minütigen Waschphase angefertigt und vorinkubiert. Dazu werden 5 µL Lösung A und 5 µL Lösung B in 490 µL PBT gegeben und während der 30 min Waschen bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wird das PBT vollständig von den Embryonen abgenommen und der vorinkubierte AB-Komplex für 30 min bis 1 h schüttelnd bei RT auf den Embryonen inkubiert. Danach wird der AB-Komplex abgenommen und die Embryonen dreimal für 10 min in PBT gewaschen.

Auf die Embryonen wird jeweils 500 µL DAB-Färbereagenz gegeben, bei Bedarf kann 5 µL NiCl₂ zugegeben werden. Die Embryonen werden in der Färbereagenz in ein Blockschälchen überführt und die Farbreaktion durch Zugabe von 1 µL 30 % H₂O₂ gestartet. Nach ausreichender Färbung wird die Färbereagenz abgenommen und die Färbung mit PBT abgestoppt. Die Embryonen werden anschließend mehrmals mit PBT gewaschen.

Die Färbung erfolgt zunächst wie bei einem sekundärem biotinyliertem Antikörper. Der sekundäre Antikörper wird für 2h auf den Embryonen inkubiert, gefolgt von dreimal Waschen für 10 min in PBT und 30 bis 60 minütiger Inkubation des AB-Komplexes. Anschließend werden die Embryonen erneut dreimal für 10 min in PBT gewaschen, um ungebundenen AB-Komplex zu entfernen. Das Fluoreszenz-gekoppelte Tyramid wird in einer 1:50 Verdünnung in Amplifizierungslösung für 3-10 min auf die Embryonen gegeben (abgedunkelt), um die Bindung des Fluoreszenz-markierten Tyramids an die Peroxidase des AB-Komplexes und damit eine Verstärkung des Signals zu erreichen. Ungebundenes Tyramid wird durch dreimaliges Waschen für 10 min in PBT entfernt, bevor die Embryonen in Fluoromount-GTM eingebettet werden. Die Lagerung der Embryonen sollte stets im Dunkeln erfolgen. Als Fluorophore werden Fluorescein und Tetramethylrhodamin verwendet.

Sekundäre, Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelte Antikörper werden in einer 1:200 Verdünnung in PBT eingesetzt. Die Inkubation sollte für 2 h unter Schütteln in einem abgedunkelten Gefäß stattfinden, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern. Nach der Inkubation des sekundären Antikörpers wird der Überstand abgenommen und die Embryonen dreimal für 10 min in PBT gewaschen. Anschließend wird das PBT vollständig abgenommen und die Embryonen in Fluoromount-GTM eingebettet. Die Lagerung der Embryonen sollte stets im Dunkeln erfolgen.

DAB-Färbereagens	10 mg DAB (1Tablette) in 20 mL PBT bei 37°C lösen Lagerung bei -20°C
-------------------------	--

Die in-vitro-Synthese DIG-markierter RNA-Sonden erfolgt unter Verwendung von linearisierter Plasmid-DNA sowie einer entsprechenden RNA-Polymerase, und liefert RNA-Sonden mit definierter maximalen Länge und Einzelstrangspezifität. Dazu wird Plasmid-DNA stromabwärts der zu transkribierenden DNA restriktionsenzymatisch linearisiert. Die restringierte DNA wird über Ethanol-Präzipitation aufgereinigt. Für die in-vitro-Transkription werden 1 µg der restringierten Plasmid-DNA, 2 µL 10x-DIG-RNA-Labeling-Mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-UTP), 2 µL 10x-Transkriptionspuffer und 2 µL der RNA-Polymerase (T3-, T7- oder Sp6-RNA-Polymerase) in einem Gesamtvolumen von 20 µL für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Polymerase startet die Transkription auf der der Restriktionsschnittstelle gegenüberliegenden Seite der Multiplen-Klonierungs-Stelle. Die Herstellung Biotin-markierter Sonden erfolgt analog, nur dass 10x-Biotin-RNA-Labeling Mix verwendet. Die RNA-Sonden werden durch Ethanolpräzipitation gefällt und in einem 1:1-Gemisch aus A.dest und Hybridisierungslösung aufgenommen, in dem sie bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Zu Beginn werden die in MeOH aufbewahrten Embryonen dreimal für 5 min in 1 mL PBT gewaschen. Das Wasserbad während der Waschschrte auf 100°C erhitzt und nach Erreichen dieser Temperatur ausgeschaltet. Die Eppendorf-Cups mit den Embryonen werden in dem heißen, aber nicht mehr kochenden Wasser für 6 min inkubiert, auf Eis gestellt und zweimal kurz mit PBT gewaschen. Die Refixierung der Embryonen findet für 20 min in 4 % F-PBS auf einem Horizontalschüttler statt. Zur Entfernung der Fixierlösung wird fünfmal für 5 min mit PBT gewaschen. Zuerst werden die Embryonen in 1 mL PBT/Hybridisierungslösung (1:1) und anschließend in 1 mL Hybridisierungslösung für jeweils 10 min inkubiert. Die Prähybridisierung der Embryonen erfolgt bei Verwendung von RNA-Sonden bei 55°C für 1 h im Wärmeblock. Währenddessen wird die Sonde dem Spotttest entsprechend in Hybridisierungslösung verdünnt (1:100) und für 15 min bei 97°C zur Denaturierung gekocht.

Der Überstand wird von den Embryonen entfernt, die Sonde unverzüglich hinzugefügt und ü. N. im Wärmeblock bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Embryonen dreimal für 20 min in vorgewärmter (55°C) Hybridisierungslösung und einmal für 20 min in Hybridisierungslösung/PBT (1:1) gewaschen. Anschließend werden die Embryonen fünfmal für 10 min in PBT bei RT geschwenkt.

Der auf WT Embryonen präabsorbierte α -DIG-AP-Antikörper (α -DIG-AP-Antikörper, 1:2000) wird für 2 h bei RT schwenkend auf den Embryonen inkubiert. Dreimaliges Waschen in 1 mL PBT geht dem Umpuffern für dreimal 20 min in 1x NBT-Puffer (pH 9,5) mit 0,1 % Tween (frisch zugesetzt) voraus. Die Embryonen werden in Blockschälchen überführt und mit der Färbelösung (1 mL NBT-Puffer mit 4 μ L NBT und 3,5 μ L X Phosphat (BCIP)) überschichtet. Die Reaktion wird im Dunkeln inkubiert, mehrmals kontrolliert und durch mehrmaliges Waschen in PBT gestoppt. Zum Entwässern werden die Embryonen einer Alkoholreihe unterzogen, die aus zweimal 10 min in 70 % EtOH und zweimal 10 min in 96 % EtOH besteht. Die Embryonen verbleiben ü. N. in 96 % EtOH, bevor sie am nächsten Tag in Epon als Dauerpräparate eingedeckelt werden können

20x SSC	3 M NaCl 0,3 % Na ₃ Citrat pH 7,0 einstellen
Hybridisierungslösung	50 % Formamid 5 x SSC 100 μ g/ μ L Lachssperma DNA 50 μ g/ μ L Heparin 0,1 % Tween ²⁰
NBT-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl 100 mM Tris 0,1 % Tween ²⁰

5.3.5. Herstellen von Dauerpräparaten

a) Einbettung in Glycerin

Das PBT wird vollständig von den gefärbten Embryonen abgenommen, 0,5 mL 70 % Glycerin dazu gegeben und ü. N. bei 4°C gelagert. Die abgesunkenen Embryonen werden mit wenig 70 % Glycerin auf einen Objektträger transferiert und eingedeckelt.

b) Einbettung in Epon

Zur Einbettung in Epon müssen die Embryonen vorher in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden (zweimal 10 min in 1 mL 70 % EtOH, zweimal 10 min in 1 mL 96 % EtOH) und verbleiben ü. N. in 96 % EtOH, bevor sie am nächsten Tag in Epon eingedeckelt werden können. Nach gleichmäßiger Verteilung der Embryonen wurde ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt und die Präparate zur Aushärtung mindestens 24 h (besser 48 h) bei 60°C gelagert. Die Aufbewahrung der Objekte ist bei RT für mehrere Monate möglich und sie stehen zur Analyse unter dem Lichtmikroskop zur Verfügung.

Epon	51,5 % (w/v) Epon 812 28 Epon Härter DDS 19 Epon Härter MNA 1,5 beschleuniger DMP 30
-------------	---

5.4.4. Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die spezifische Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgt nach der Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction, PCR). Voraussetzung für die Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide, sog. Primer, die sich komplementär an endständige Sequenzbereiche anlagern. Durch zyklische Wiederholungen von Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Polymerisierungsschritt wird eine exponentielle Amplifikation des spezifischen DNA-Fragments erreicht.

Die PCR wird unter Verwendung der thermostabilen *Taq*-Polymerase oder unter Verwendung der thermostabilen Accu-Prime™-*Taq*-DNA-Polymerase oder der Vent-DNA-Polymerase, welche beide durch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität eine bessere Fehlergenauigkeit aufweisen sollte, in den folgenden Reaktionsansätzen durchgeführt:

	<i>Taq</i> -Polymerase (pEQLAB)	Accu-Prime™- <i>Taq</i> -DNA- Polymerase	Vent-DNA-Polymerase
DNA	10-25 ng	10-25 ng	10-25 ng
Primer forward	20 pmol	20 pmol	20 pmol
Primer reverse	20 pmol	20 pmol	20 pmol
Puffer	10x Puffer Y	10x AccuPrime Puffer I	10x Themopol-Puffer
dNTPs	10 mM	---	---
MgCl ₂	(25)	---	---
Polymerase	1 µL ≈ 1U	0,2 µL ≈ 1U	1 µL ≈ 1U
H ₂ O	xxx ad 50 µL	xxx ad 50 µL	xxx ad 50 µL

Die PCR-Reaktion wird im Thermo-Cycler mit den folgenden Cycling-Bedingungen durchgeführt:

1.	Denaturierung:	93-95°C	5-10 min
2.	Denaturierung:	93-95°C	30 sek
3.	Hybridisierung:	60°C	1 min
4.	Polymerisierung:	72°C	30 sek – 1,5 min
5.	Polymerisierung:	72°C	10 min

Die Accu-Prime™-*Taq*-DNA-Polymerase benötigt im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase und Vent-Polymerase eine Hybridisierungstemperatur von 68°C. Die Polymerisierungszeit richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments, dabei wird 1 min pro 1 kb des zu amplifizierenden PCR-Produkts vorgeschlagen. Die Hybridisierungszeit, sowie -temperatur kann je nach Primerkombination variiert werden. Schritte 2-4 wiederholen sich zyklisch 30-34 mal.

5.4.5. Topo-Klonierung von PCR-Produkten

Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkten wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kit zwischenkloniert. Dafür wird hier die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase, ein Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts anzuhängen, ausgenutzt. Der pCR®II-TOPO besitzt ein zu diesem Adenosinrest komplementäres, überhängendes 3'-Desoxythymidin (T), welches eine effiziente Ligation mit dem PCR-Insert erlaubt. Die für die Reaktion benötigte Topoisomerase ist über einen Tyrosinrest kovalent an den 3'-Phosphatrest des Vektors gebunden. Der Angriff des 5'-OH-Endes des Inserts führt zur Bildung einer neuen Phosphodiesterbrücke zwischen Insert und Vektor, sowie zur anschließenden Freisetzung der Topoisomerase. Die Klonierung von PCR-Produkten, welche mit der Accu-Prime™-*Taq*-DNA-Polymerase oder der Vent-DNA-Polymerase amplifiziert wurden, erfolgt unter Verwendung des Zero Blunt TOPO® Cloning® Kit.

Für die Reaktion werden 1-3 µL des PCR-Produkts und 0,2 µL pCR®II-TOPO, bzw. 0,5 µL pCR®-TOPO® Blunt in einem Endvolumen von 6 µL für 5 bis 20 min bei RT inkubiert. Die Transformation des Reaktionsansatzes erfolgt in chemisch-kompetente DH5α-Zellen, wird Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgt bei 37°C ü.N.. Nach Anzucht der Bakterien wird die Plasmid-DNA durch Mini-Präparation isoliert und durch Restriktionsanalyse analysiert.

5.4.6. Präparation von Plasmid-DNA aus *E.Coli* (alkalische Lyse)

Am Vortag werden einzelne Kolonien in 3 mL LB-Medium mit entsprechender Antibiotika-Zugabe angeimpft und ü. N. bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die ÜNK wird in Eppendorf-Cups überführt und für 5 min bei 4.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Pellet wird in 250 µL E1-Lösung resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien werden in 250 µL E2-Lösung hinzugegeben und das Eppendorf-Cup vier- bis sechsmal invertiert, bis ein klares Lysat entstanden ist. Nach 5 minütiger Inkubationszeit werden zur Neutralisation des Lysats 250 µL E3-Lösung hinzugegeben und das Eppendorf-Cup invertiert bis sich ein weißes, flockiges Präzipitat gebildet hat. Das Lysat wird wiederum für mindestens 20 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die im klaren Überstand befindliche DNA wird durch Zugabe von 750 µL Isopropanol durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm und 4°C gefällt, der Überstand abgesaugt und die gefällte DNA anschließend in 100 µL 70 % EtOH gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wird der Überstand vollständig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die getrocknete DNA in 50 µL A.dest oder TE aufgenommen und bei 65°C gelöst. 5-10 µL der DNA-Lösung wird anschließend restriktions-analytisch untersucht.⁷

Die E1, E2 und E3 Lösungen werden hierbei nach Anleitungen des JETstar Plasmid Midiprep Kit der Firma GENOMED (siehe Kap. Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.Coli* 5.4.7) angesetzt.

5.4.7. Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.Coli*

Die Midi-Präparation erfolgt mit dem JETstar Plasmid Midiprep Kit der Firma GENOMED.

Am Vortag wurde 50 µL Kultur in 50 mL LB-Medium mit entsprechender Antibiotika-Zugabe angeimpft und ü.N. bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die ÜNK wird in 50 mL Falcons überführt und für 5 min bei 4.000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird in 4 mL E1-Lösung (RNase-haltig, bei 4°C lagern) resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien werden 4 mL E2-Lösung hinzugegeben und das Falcon vier- bis sechsmal invertiert, bis ein klares Lysat entstanden ist. Nach 5 minütiger Inkubationszeit werden zur Neutralisation des Lysats 4 mL E3-Lösung hinzugegeben und das Falcon invertiert bis sich ein weißes, flockiges Präzipitat gebildet hat. Das Lysat wird wiederum für 30 min bei 6.000 rpm in der Zentrifuge zentrifugiert, währenddessen wird die Säule mit 10 mL E4-Lösung äquilibriert. Die äquilibrierte Säule wird mit dem klaren Überstand des Lysats beladen. Nach vollständigem Durchlauf wird diese zweimal mit 10 mL E5-Lösung gewaschen. Die Elution erfolgt mit 5 mL E6-Lösung in ein 15 mL Falcon. Das Eluat wird zunächst mit 3,5 mL Isopropanol durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 6.000 rpm und 4°C gefällt, der Überstand abgesaugt und das Pellet anschließend in 2 mL 70 % EtOH gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wird der Überstand vollständig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet gründlich getrocknet. Das Pellet wird in 100 µL TE aufgenommen und bei 65°C gelöst. Von einer 100x-Verdünnung wird die Absorption bei 260 nm im Photometer gemessen und Konzentration der DNA nach der folgenden Formel berechnet:

DNA-Konzentration (µg/mL) = $A_{260} \times 50 \times V$ (A_{260} = Absorption bei 260 nm, V = Verdünnungsfaktor).

E1-Lösung (Zell-Resuspension)	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase
E2-Lösung (Zell-Lyse)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
E3-Lösung (Neutralisierung)	3,1 M KAc Mit Essigsäure auf pH 5,5
E4-Lösung (Equilibrierung der Säulen)	600 mM NaCl 100 mM NaAc 0,15 % (v/v) TritonX-100 Mit Essigsäure auf pH 5,0
E5-Lösung (Waschen der Säulen)	800 mM NaCl 100 mM NaAc Mit Essigsäure auf pH 5,0
E6-Lösung (DNA-Elution)	1,5 M NaCl 100 mM NaAc Mit Essigsäure auf pH 5,0

5.4.8. Aufreinigung von DNA durch Ethanolpräzipitation

Der DNA werden 1/10 VT 3 M NaAc sowie 2,5 VT 100 % EtOH zugegeben und diese durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand kann verworfen werden und das Pellet wird in 70 % EtOH durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm und 4°C gewaschen. Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet nach gründlichen Trocknen in A.dest oder TE aufgenommen.

5.4.9. Aufreinigung von DNA durch Isopropanolpräzipitation

Die zu reinigende DNA wird durch Zugabe von 0,7 VT Isopropanol und 30 minütigem Zentrifugieren bei 13.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet erneut in 70 % EtOH für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets wird dieses in einem geeigneten Volumen A.dest oder TE aufgenommen.

5.4.10. Analytischer Restriktionsverdau

Für den analytischen Restriktionsverdau werden 0,2 bis 1 µg DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestehend aus DNA, 10x-Reaktionspuffer, 1 bis 3 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 20 µL wird für 2 h im 37°C-Wasserbad inkubiert; anschließend auf einem 1 % TBE-Agarosegel aufgetragen und bei 70 bis 90 V aufgetrennt.

5.4.11. Präparativer Restriktionsverdau

Für den präparativen Restriktionsverdau wurden 3 µg DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestehend aus DNA, 10x-Reaktionspuffer, 15 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 40 µL wird für 3 h im 37°C Wasserbad inkubiert. Der gesamte Ansatz wird je nach Größe der zu isolierenden Fragmente auf einem 0,8 %, 1 % oder 1,3 % TBE-Agarosegel aufgetragen und bei 50-60 V aufgetrennt.

Sollten verschiedene Restriktionsendonukleasen verwendet werden, die sich in ihren optimalen Pufferbedingungen unterscheiden, erfolgt der Restriktionsverdau in getrennten Schritten. Zunächst wird der Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease durchgeführt, welche den Puffer mit den geringeren Salzkonzentrationen benötigt. Die Reinigung des Restriktionsansatzes erfolgt durch Ethanolpräzipitation. Nach gründlichem Trocknen des Pellets wird dieses in A.dest aufgenommen und der Restriktionsverdau mit der zweiten Restriktionsendonuklease durchgeführt. Der gesamte Ansatz wird je nach Größe der zu isolierenden Fragmente auf einem 0,8 %, 1 % oder 1,3 % TBE-Agarosegel aufgetragen und bei 60 V aufgetrennt.

5.4.12. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

5.4.12.1. Elution über JETsorb Gel Extraktion Kit

(Genomed, nach Angaben des Herstellers)

Die Bande wird unter dem UV-Illuminator aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cup überführt. Zum Lösen der DNA-haltigen Agarose werden pro 100 mg Agarose-Gel 300 µL A1-Puffer und 10 µL JETsorb Suspension zugegeben. Nach kurzem Vortexen erfolgt eine Inkubation für 15 min bei 50°C, um die Bindung der DNA an die Matrix zu gewährleisten. Dabei sollte ein kurzes Mischen aller 3 min erfolgen. Nach der Inkubationszeit wird die Matrix für 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Nach dem vollständigen Entfernen des Überstands, erfolgt die Resuspension des Pellets (DNA an Matrix gebunden) in 300 µL A1-Puffer und ein Zentrifugationsschritt für 30 sek bei 13.000 rpm. Das Pellet wird in 300 µL A2-Puffer resuspendiert und erneut für 30 sek bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschritt wird ein zweites Mal wiederholt. Nach dem vollständigen Trocknen des Pellets mit der Wasserstrahlpumpe (Pellet schneeweiß gefärbt), erfolgt das Lösen der DNA in 20 bis 30 µL TE durch eine 15 minütige Inkubation bei 50°C. Durch 30 sek zentrifugieren bei 13.000 rpm wird die Matrix pelletiert. Der DNA-haltige Überstand wird in ein neues Eppendorf-Cup überführt und die Konzentration der DNA durch Auftragen von 2 µL auf ein 1 % TBE-Agarosegel bestimmt.

5.4.12.2. Elution über GFXTM PCR and Gel Band Purifikation Kit

(Amersham Pharmacia Biotech, nach Angaben des Herstellers)

Die Gelbande wird unter dem UV-Illuminator aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Cup überführt. Für 100 mg Gelbande werden 200 µL Capture-Buffer hinzugefügt und für 15 min bei 60°C inkubiert, so dass sich die Gelmatrix vollständig gelöst hat. Die Probe wird in die GFX-Säule überführt und zum Binden der DNA an die Matrix für 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Säule für 30 sek bei 13.000 rpm in der Mikrozentrifuge zentrifugiert, der entstandene Durchfluss kann verworfen werden. Zum Waschen der DNA werden 500 µL Washing-Buffer auf die Säule gegeben und erneut bei 30 sek und 13.000 rpm zentrifugiert. Zum Eluieren der DNA wird die Säule in ein neues Eppendorf-Cup überführt und 10 bis 50 µL Elutionspuffer (TE pH 8,0) zugegeben. Nach einer 1-minütiger Inkubationszeit bei RT erfolgt die Elution der DNA durch 1 minütiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm. Die Konzentration der DNA wird durch Auftragen von 2 µL auf ein 1 % TBE-Agarosegel bestimmt.

5.4.13. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden

Um eine Religation zwischen der 3'-Hydroxylgruppe und der 5'-Phosphatgruppe eines linearisierten Vektors zu verhindern, wird die Phosphatgruppe am C5-Atom mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (calf intestine phosphatase CIP) abgespalten. 2 bis 3 µg des zuvor restringierten Vektors werden unter Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase und 10x-Phosphatasepuffer mit A.dest auf das gewählte Endvolumen aufgefüllt und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgt für 15 min bei 65°C.

5.4.14. Ligation

Das Verhältnis von einzusetzendem Insert und Vektor berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$\frac{ngVektor * Insertkb}{kbVektor} * \frac{3}{1}$$

Der Ligationsansatz bestehend aus Insert, Vektor, 10x-Reaktionspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase wird 3 h bei RT oder im 16°C-Wasserbad ü.N. inkubiert. Ein Viertel oder die Hälfte des Ligationsansatzes werden in chemisch oder elektrisch kompetente Zellen transformiert.

5.4.15. In-Fusion Klonierung

(Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)

Das In-Fusion Enzym fügt lineare DNA-Fragmente zusammen, die über homologe Enden von mind. 15 bp verfügen. Dazu werden PCR-Primer hergestellt, die 15 bp Sequenz-Homologie zu den Enden des linearisierten Zielvektors aufweisen (In-FusionTM Primer Design Tool <http://bioinfo.clontech.com/infusion/convertPcrPrimersInit.do>). Mit diesen Primer wird spezifisch das Insert amplifiziert, aufgereinigt und in der In-Fusion Klonierungsreaktion in den linearisierten Vektor rekombiniert (siehe Abb. 50). Die Reaktion fügt dabei das Insert gerichtet in den Vektor ein, ohne zusätzliche Basen zu erzeugen.

Für die In-Fusion Klonierung muss das PCR-Produkt entweder über Gel-Extraktion (siehe Kap. 5.4.12) oder durch Behandlung mit dem sogenannten Cloning Enhancer aufgereinigt werden. Dazu werden 2 µL Cloning Enhancer zu 5 µL PCR-Produkt gegeben und für jeweils 15 min bei 37°C und 80°C (Inaktivierung) im Thermo-Cycler inkubiert. Die für die In-Fusion Reaktion benötigte Menge an gereinigtem PCR-Produkt und linearisiertem Vektor wird nach Angaben des Herstellers berechnet (In-FusionTM Molar Ratio Calculator <http://bioinfo.clontech.com/infusion/molarRatio.do>) und der Reaktionsansatz unter Zugabe von 1 µL 5x In-Fusion Reaktions-Puffer und 1 µL In-Fusion Enzym in einem Gesamtvolumen von 5 µL für 15 min bei 37°C, gefolgt von 15 min bei 50°C im Thermo-Cycler inkubiert. Anschließend wird der Reaktionsansatz mit 1xTE-Puffer auf 50 µL aufgefüllt und davon 3-5 µL in chemisch kompetente Zellen transformiert. Daraus resultierende Kolonien werden in Kultur genommen, Plasmid-DNA isoliert und restriktionsanalytisch untersucht.

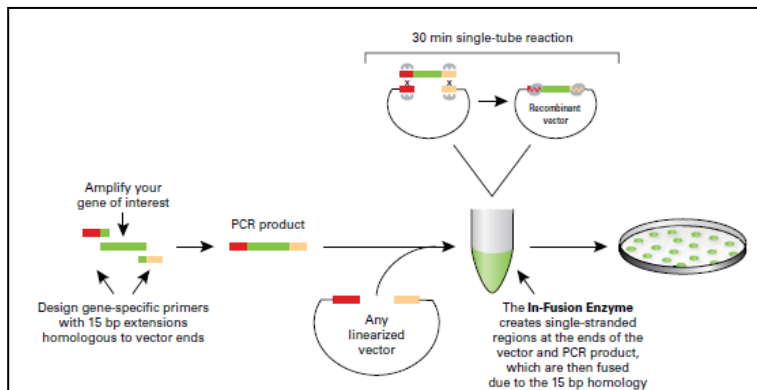


Abb. 50 In-Fusion Klonierung -- Methodik

Das Zielgen wird durch spezifische Primer amplifiziert, die 15 bp Homologie zu den Enden eines linearisierten Vektors aufweisen. In der In-Fusion Reaktion erzeugt das In-Fusion Enzym einzelsträngige Enden von PCR-Produkt und Vektor, die anschließend zusammengefügt werden (Abb aus In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit User Manual PT-4065-1).

5.4.16. Gerichtete Klonierung von PCR-Produkten mit 5' CACC-Überhang in den pENTR/D-Topo

(pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit, Invitrogen)

Die gerichtete Klonierung in pENTR benötigt PCR Produkte mit 5' CACC-Überhang. Für die Reaktion werden 1-3 µL des PCR-Produkts und 0,5 µL pENTR/D-Topo mit 1 µL Salz-Lösung (aus dem pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit) in einem Endvolumen von 6 µL für 5 bis 20 min bei RT inkubiert. Die Hälfte des Reaktionsansatzes wird in chemisch-kompetente DH5α-Zellen transformiert und auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgt bei 37°C ü.N.. Nach Anzucht der Bakterien wird die Plasmid-DNA durch Mini-Präparation isoliert und durch Restriktionsanalyse analysiert.

5.4.17. Gateway® -Klonierung

LR Clonase™ II Enzym Mix (Invitrogen)

Die Gateway®-Technologie ist eine universelle Klonierungsmethode, die die Eigenschaften der sequenzspezifischen Rekombination des Bakteriophagen Lambda 1 für den schnellen und effizienten Transfer von DNA in einen Zielvektor nutzt. Im Detail findet eine Rekombination zwischen einem *attL1*-Gen-*attL2* Eingangsklon und einem *attR1-ccdB-attR2* Zielvektor statt. Rekombination zwischen *attR* und *attL* Stellen resultiert in einem Expressionsklon *attB1*-Gen-*attB2* und einem Rekombinationsnebenprodukt *attP1-ccdB-attP2*. Dabei katalysiert der Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix die *in vitro* Rekombination zwischen dem Eingangsklon (pENTR/D-TOPO, Gen flankiert von *attL*-Stellen) und dem *attR*-beinhaltenden Zielvektor (in dieser Arbeit *pUAS-attB-rfa-Tag* oder *pUAS-attB-Tag-rfa*, *rfa* steht für die Insertion des Gens) (siehe Abb. 51 Methodik der Gateway-Klonierung). Der Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix beinhaltet alle für die Rekombination notwendigen Enzyme, Komponenten und Pufferbedingungen.

Für die *in vitro* Rekombination werden 50-150 ng des pENTR/D-Topo-Klons, 150 ng des Zielvektors (*pUAS-attB-rfa-Tag*) in einem Gesamtvolumen von 4 µL in einem Eppendorf-Cup bei RT gemischt. Der Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix wird auf Eis für ungefähr zwei Minuten aufgetaut. Zu jedem Reaktionsansatz werden 1 µL des Enzym-Mixes hinzugegeben, kurz gevortext, abzentrifugiert und bei 25°C für eine Stunde inkubiert. Der Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix muss sofort wieder eingefroren werden. Nach der einstündigen Inkubation des Ansatzes wird 0,5 µL der Proteinase K Lösung hinzugefügt und der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert, um eine Inaktivierung des Enzymgemisches zu erreichen. Anschließend wird 1 µL eines jeden Reaktionsansatzes in chemisch kompetente Zellen transformiert, daraus resultierende Kolonien in Kultur genommen, Plasmid-DNA isoliert und analysiert.

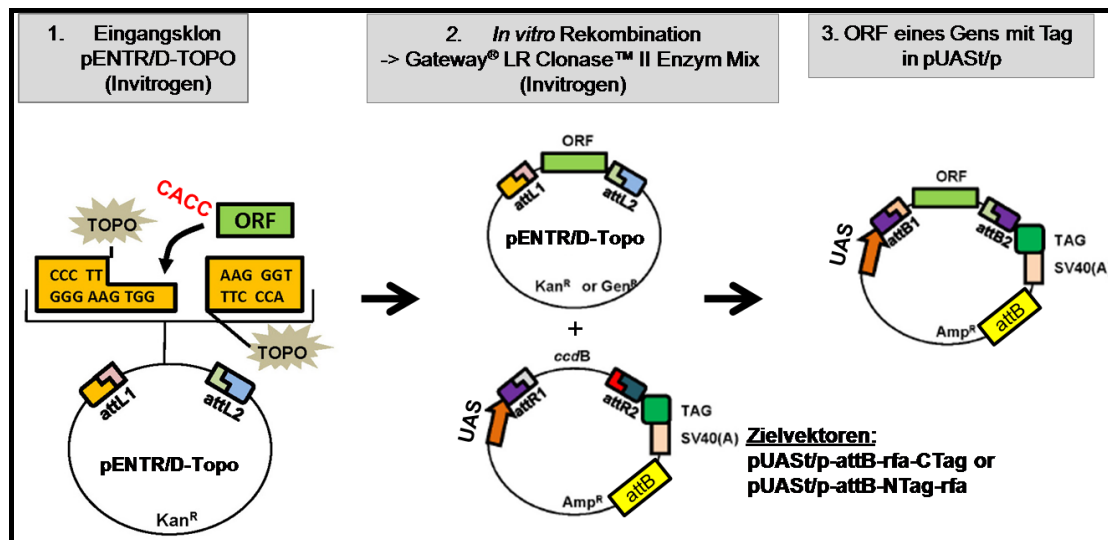


Abb. 51 Methodik der Gateway-Klonierung

Gerichtete Klonierung eines PCR-Produktes mit 5' CACC-Überhang in den pENTR/D-TOPO liefert einen attL1-Gen-attL2 tragenden Eingangsklon. Die durch den Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix katalysierte *in vitro* Rekombination zwischen attL-Stellen des Eingangsklons und den attR-Stellen des Zielvektors führt zu einem Transfer des ORFs in den Zielvektor. Eine effiziente Selektion erfolgt über die Wahl der Resistenzen (Kan^R auf pENTR/D-TOPO und Amp^R auf Zielvektoren), sowie das für Bakterien toxische *ccdB*-Gen (vor der Rekombination im Zielvektor, danach im Nebenprodukt). Als mögliche Zielvektoren stehen verschiedene pUAS-Varianten zur Verfügung, die N- oder C-terminale Fusionsproteine mit verschiedenen Tags ermöglichen (pUAS/p-attB-rfa-N-Tag oder pUAS/p-attB-rfa-C-Tag). Zusätzlich befinden sich weitere attB-Sequenzen auf dem Zielvektor, so dass das Plasmid zur ϕ 31-vermittelten Integration in *Drosophila* genutzt werden kann. Abkürzungen: Amp^R = Ampicillin-Resistenzgen, *ccdB* = inhibiert Wachstum von *E. coli*, Kan^R = Kanamycin-Resistenzgen, ORF = offener Leserahmen, SV40 = SV40 Terminationssignal, Tag = GFP-, mCherry- oder myc-Sequenzen, UAS = upstream aktivierende Sequenzen. (Abb. modifiziert nach Akbari, 2009).

5.4.18. Transformation von DNA in *E. coli*

5.4.18.1. Chemotransformation

(Sambrook *et al.*, 1989)

Chemokompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut, die zu transformierende DNA dazugegeben und für 15-30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wird für 1 bis 3 min bei 37°C gegeben und anschließend sofort 300 μ L vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Nach 45 min Inkubation auf dem Schüttler bei 37°C werden die Zellen auf Selektiv-Platten ausplattiert und bei 37°C ü. N. inkubiert.

5.4.18.2. Herstellung chemokompetenter Zellen

250 mL LB-Medium werden mit 2,5 mL einer frischen *E. coli*-Kultur angeimpft und bei 37°C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 kultiviert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4.000 rpm in der Ultrazentrifuge, 4°C), in 80 mL kaltem RF1-Puffer resuspendiert und wiederum 15 min bis eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut pelletiert (10 min, 4.000 rpm in der Ultrazentrifuge, 4°C), in 20 mL RF2-Puffer aufgenommen und 15 min bis 1 Stunde auf Eis inkubiert. Schließlich wird die Zellsuspension in 50 bis 100 μ L Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

RF1 10 mM RbCl₂
50 mM MnCl₂
30 mM KCl
10 CaCl₂
15 % (w/v) Glycerin
pH 5,8 einstellen

RF2 10 mM MOPS (pH 6,8)
10 mM RbCl₂
75 mM CaCl₂
15 % (w/v) Glycerin
pH 8 einstellen

5.4.19. Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgt durch AGOWA GmbH

Für eine Standard-Sequenzierung werden 800 ng -1 µg der Plasmid-DNA zusammen mit 20-25 pmol eines Primers in einem Gesamtvolumen von 10 µL gelöst. Für häufig verwendete Primer kann der Primer auch optional von der AGOWA GmbH zugegeben werden.

Für die Sequenzierung von PCR Produkten richtet sich die benötigte Menge an DNA nach der Größe des PCR-Produkts. PCR-Produkt und Primer (20-25 pmol) werden in einem Gesamtvolumen von 10 µL gelöst.

5.5. Methoden Hefe-Zwei-Hybrid-System

(MATCHMAKER Two-Hybrid System, Clontech)

5.5.1. Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine Methode, um direkte Protein-Protein-Interaktionen zu studieren und basiert auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsaktivatoren aus physikalisch trennbaren, funktionell unabhängigen Domänen bestehen. Solche Transkriptionsaktivatoren beinhalten eine DNA-Bindedomäne (DNA-BD), die die Bindung des Transkriptionsfaktors an spezielle Promotorsequenzen vermittelt und einer Aktivierungsdomäne (AD), welche den Transkriptionsapparat rekrutiert und aktiviert, um downstream von der DNA-Bindedomäne liegende Gene zu transkribieren. In der Regel sind beide Domänen zusammen für die Transkriptionsaktivierung notwendig und Bestandteil eines Proteines. Physikalisch getrennte DNA-BD oder AD sind demnach nicht in der Lage, Gene zu transkribieren. Werden DNA-BD und AD jedoch wieder in physikalische Nähe gebracht, so kann die Transkriptionsaktivierung wiederhergestellt werden (siehe Abb. 52)

Im MATCHMAKER LexA-basierten Hefe-Zwei-Hybrid System wird die DNA-BD des prokaryotischen LexA Proteins und die AD des *E. Coli* Proteins B42 mit Proteinen fusioniert, die potentiell miteinander interagieren. Interaktion zwischen Köder-Protein (fusioniert mit der DNA-BD) und dem Beute-Protein (fusioniert mit AD) generiert einen funktionellen Transkriptionsaktivator mit Bindungsaffinität für LexA-Operatoren. Dieser Transkriptionsaktivator kann downstream von LexA-Operatoren befindliche Reportergene aktivieren (z.B. *leu2* oder *lacZ*) und somit eine Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein sichtbar machen.

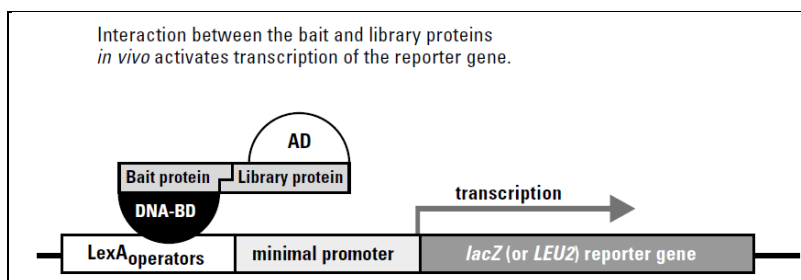


Abb. 52 Schematische Darstellung des MATCHMAKER LexA Two-Hybrid Systems

Das mit dem LexA-Protein (inklusive LexA DNA-Bindedomäne DNA-BD) fusionierte Köderprotein (Bait) rekrutiert bei Interaktion mit dem Beuteprotein (Library- oder Prey) das Transkriptions aktivierende B42-Protein (Aktivierungsdomäne AD), so dass downstream liegende Reportergene angeschaltet werden. Im MATCHMAKER LexA Two-Hybrid System werden *lacZ* und *leu2* als Reportergene verwendet. (Abb. aus Clontech User Manual PT3040-1)

5.5.2. Hefe-Nährmedien

Als Vollmedium für Anzucht und Wachstum der Hefezellen dient YPD (Yeast Pepton Dextrose), welches alle erforderlichen Kohlen- und Stickstoffquellen, essentielle Aminosäuren, sowie Purin und Pyrimidinbasen enthält.

YPD-Vollmedium/YPD-Platten

50 g/L YPD Broth

2 % (w/v) Agar (bei Platten)

Die meisten Hefe-Vektoren enthalten sogenannte Auxotrophiemarker, die eine positive Wachstumsselektion der transformierten Hefezellen auf verschiedenen Mangelmedium erlaubt. Als Basis eines solchen Mangelmediums dient synthetisches Minimalmedium (SD-Medium, synthetic drop out). Dieses SD-Medium wird durch Zugabe von essentiellen Aminosäuren, Purin und Pyrimidinbasen, sowie einer Kohlen- und Stickstoffquelle den jeweiligen Selektionsbedingungen angepasst. In den SD-Mangelmedien wird dabei auf die Aminosäuren verzichtet, auf deren Synthese durch das Vorhandensein der Auxotrophiemarkers in dem transformierten Hefezellen selektioniert werden soll.

40% Glucose/Dextrose	40 % (w/v) Glucose Steril filtrieren, Lagerung bei 4°C
40% Galaktose	40 % (w/v) Galaktose Steril filtrieren, Lagerung bei 4°C
40% Raffinose	40 % (w/v) Raffinose Steril filtrieren, Lagerung bei 4°C
10x BU-Salze	70 g Na ₂ HPO ₄ 30 g NaH ₂ PO ₄ pH 7,0 einstellen, autoklavieren
10x DO-HULT	1,4 g/L Yeast Synthetisches Drop-Out Zusatz (ohne Histidin, Uracil, Leucin und Tryptophan) Autoklavieren, Lagerung bei 4°C
10x Leu	1 g/L Leucin Autoklavieren, Lagerung bei 4°C
SD-HUT/Glu+BU (Selektionsplatten)	6,7 g/L Yeast Nitrogen Base 1 x DO-HULT 1 x LEU 1 x BU-Salze 2 % (w/v) Glucose 2 % (w/v) Agar
SD-HULT/Gal+Raf+BU+X-Gal (Induktionsplatten)	6,7 g/L Yeast Nitrogen Base 1 x DO-HULT 1 x BU-Salze 2 % (w/v) Galaktose 1 % (w/v) Raffinose 80 mg/mL X-Gal 2 % (w/v) Agar

Die Zutaten für Platten bis auf die Zuckerlösungen mischen, autoklavieren, bis 55°C abkühlen lassen, und dann Zuckerlösungen und X-Gal zugeben. Da eine optimale Polymerisierung von Agar pH abhängig ist, wird Agar separat autoklaviert und wie die Zucker erst kurz vor dem Gießen der Lösung hinzugefügt. Lagerung der Platten erfolgt bei 4°C

5.5.3. Wachstum und Anzucht der Hefekulturen

Für optimales Arbeiten mit Hefezellen ist die Herstellung und Haltung eines Arbeitsstockes mit vereinzelter Kolonien notwendig. Dazu werden mit einer sterilen Impföse Hefezellen eines Glycerinstockes entnommen, auf YPD-Vollmedium-Platten ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert, bis einzelne Kolonien mit einem Durchmesser von 2-3 mm gewachsen sind. Bei einer Lagerung bei 4°C kann dieser Arbeitsstock bis maximal 4 Wochen verwendet werden. Die dauerhafte Lagerung eines Hefestammes erfolgt bei -80°C in Medium mit 25% Glycerin.

5.5.4. Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen (PEG/LiAc-Methode)

Für die Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen wird eine PEG/Lithiumacetat basierte Methode verwendet, die eine Transformationsrate von 10^5 Transformanden/ μg Plasmid-DNA bei Einzeltransformation bzw. 10^4 Transformanden/ μg DNA bei gleichzeitiger Transformation von zwei Plasmiden erreicht.

Folgend ist ein sogenanntes „small scale“ Protokoll beschrieben, mit dem 15-20 unterschiedliche Transformationen durchgeführt werden können. Das Arbeiten erfolgt generell unter sterilen Bedingungen. Am Vortag werden Einzelkolonien mit einem Durchmesser von 2-3 mm zunächst in 1 ml YPD-Medium inokuliert und durch kurzes Vortexen resuspendiert. Diese Kultur wird dann in 50 ml YFP transferiert und ü.N. schüttelnd bei 30°C inkubiert. Die Zellen sollten dabei die stationäre Phase erreichen und eine OD_{600} von über 1,5 aufweisen. Am Morgen wird 300 ml frisches YPD-Medium mit der ÜNK zu einer OD_{600} von ca. 0,1 angeimpft und unter Schütteln (250 rpm) bei 30°C bis zu einer OD_{600} $0,5 \pm 0,1$ inkubiert. Die Kultur wird in 6 x 50 ml Falcons überführt und die Zellen durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 1000 rpm in der Ultrazentrifuge pelletiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, werden die Zellen in A.dest gewaschen und erneut durch Zentrifugieren pelletiert. Anschließend werden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 50 ml A.dest oder 1x TE aufgenommen, in einem Falcon zusammengeführt und erneut zentrifugiert (5 min, 1.000 rpm in der Ultrazentrifuge). Der Überstand wird verworfen und die pelletierten Zellen werden in 1,5 bis 2 ml frisch zubereiteter TE/LiAc-Lösung aufgenommen. Diese kompetenten Zellen sollten innerhalb der nächsten Stunde für die Transformation mit Plasmid-DNA eingesetzt werden. In der Zwischenzeit wird die zu transformierende Plasmid-DNA zusammen mit der „Carrier“-DNA (Lachssperma-DNA) in einem Eppendorf-Cup zusammengemischt. In dem hier verwendeten MATCHMAKER Two-Hybrid System wird ein 2:1 Verhältnis von dem Vektor mit dem DNA-Bindedomäne-Fusionsprotein zu dem Vektor mit dem Aktivierungsdomäne-Fusionsprotein vorgeschlagen. Pro Transformationsansatz werden 0,1 mg Lachssperma-DNA, 2 μg DNA des DNA-Bindedomäne-Vektors (pGilda-Konstrukt) und 1 μg DNA des Aktivierungsdomäne-Vektors (pB42AD-Konstrukt) eingesetzt. Zu jedem DNA-Gemisch werden nun 0,1 ml der kompetenten Zellen gegeben und durch kurzes Vortexen gemischt. Anschließend werden jedem Transformationsansatz 0,6 ml von einer frisch zubereiteten PEG/TE/LiAc-Lösung zugegeben und für mindestens 10 sek kräftig gevortext. Nach einer 30 minütigen Inkubation der Zellen bei 30°C unter Schütteln (200-250 rpm) wird 70 μl DMSO zu jedem Transformationsansatz gegeben und durch Invertieren gemischt. Die Zellen werden nun einem Hitzeschock von 15 min bei 42°C unterzogen und für 1-2 min auf Eis gestellt. Die Zellen werden durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 5.000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Es folgt das Waschen der Zellen in jeweils 200 μl A.dest und ein erneuter Zentrifugationsschritt (5 min, 5.000 rpm). Die Zellen werden in wiederum in 150 -200 μl A.dest aufgenommen, resuspendiert und können auf entsprechenden Selektionsplatten mit Hilfe von Glaskugeln ausplattiert werden.

Kotransformanten werden durch die Anwesenheit von Auxotrophiemarkern selektioniert. Das MATCHMAKER Two-Hybrid System verwendet die Auxotrophiemarker HIS und TRP, die sich auf dem transformierten pGilda-Konstrukt, bzw. pB42AD-Konstrukt befinden. Zusätzlich befindet sich der Auxotrophiemarker URA auf dem Reporterplasmid p8op-lacZ. Auf Selektionsplatten, die kein Histidin, Uracil und Tryptophan enthalten (SD-HUT/Glu+BU), können also nur die Hefezellen wachsen, die sowohl beide Plasmide aufgenommen haben als auch das Reporterplasmid besitzen.

10x LiAc	1 M LiAc Autoklavieren. Lagerung bei 4°C
PEG	50 % (v/v) PEG3350 Lösen und autoklavieren. Lagerung bei 4°C
TE/LiAc	1 x LiAc 1 x TE
PEG/TE/LiAc	40 % PEG 1 x LiAc 1 x TE

5.5.5. Interaktionstest der Kotransformanden

Beide Fusionsproteine des MATCHMAKER LexA-basierten Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (pGilda DB-Fusionsprotein und pB24AD AD-Fusionsprotein) sind unter Kontrolle des induzierbaren Promotors Gal1. Unter Anwesenheit von Glucose im Medium wird die Expression der Fusionsproteine reprimiert, während Galaktose die Expression der Fusionsproteine induziert. Für den Interaktionstest werden daher Galaktose-haltige Platten verwendet. Der Zusatz von Raffinose im Medium sorgt für ein verbessertes Wachstum der Hefezellen.

Bei Interaktion der zu untersuchten Proteine bilden das Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne (pGilda-Konstrukt) und das Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne (pB42AD-Konstrukt) einen funktionellen Transkriptionsaktivator LexA. Dieser kann die Transkription der Reportergene aktivieren und somit eine Interaktion der zu untersuchenden Proteine sichtbar machen. Das MATCHMAKER LexA-basierte Hefe-Zwei-Hybrid-System benutzt zwei Reportergene, *lacZ* und *leu2*. Das auf dem Reporterplasmid p8op-*lacZ* lokalisierte *lacZ* Gen befindet sich unter der Kontrolle des 8-fachen LexA-Operators. Die Bindung eines funktionellen Transkriptionsaktivators LexA bewirkt die Expression der β -Galaktosidase, so dass eine Interaktion der zu untersuchenden Fusionsproteine anhand einer Blaufärbung der Kolonien auf X-Gal-haltigen Induktionsplatten (SD-HULT/Gal/Raf/BU/X-Gal) identifiziert werden kann. Als weiterer Reporter für Interaktion der Fusionsproteine dient der im Genom des Stammes EGY48 integrierte Auxotrophiemarker LEU (Leucin), welcher der Kontrolle eines 6-fachen LexA-Operators unterliegt. Transkriptionsaktivierung des *leu2*-Gens durch Bindung von funktionellem LexA ermöglicht dem sonst *leu2*⁻ auxotrophischen Hefestamm ein Wachstum auf Minimalplatten, die kein Leucin enthalten. Eine positive Interaktion der zu untersuchenden Fusionsproteine kann also durch Wachstum der Kolonien auf den Induktionsplatten (SD-HULT/Gal/Raf/BU/X-Gal) identifiziert werden.

Zur Durchführung des Interaktionstests werden 10-20 Kotransformanten mit sterilen Zahnstochern auf Induktionsplatten (SD-HULT/Gal/Raf/BU/X-Gal) überstrichen und nach zwei und drei Tagen Inkubation der Platten ausgewertet. Interaktion der Fusionsproteine wird durch Wachstum der Kolonien (Selektion über *leu2*) und Blaufärbung (Selektion über *lacZ*) erkannt.

6. LITERATUR

- Abramovici H, Gee SH** (2007) Morphological changes and spatial regulation of diacylglycerol kinase-zeta, syntrophins, and Rac1 during myoblast fusion. *Cell Motil Cytoskeleton*. 64(7):549-67.
- Albertinazzi C, Za L, Paris S, de Curtis** (2003) ADP-Ribosylation Factor 6 and a Functional PIX/p95-APP1 Complex Are Required for Rac1B-mediated Neurite Outgrowth. *Mol Biol Cell* 14: 1295-1307
- Antonny B, Beraud-Dufour S, Chardin P, Chabre M** (1997) N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry*. 36(15): 4675-84.
- Artero RD, Castanon I, Baylies MK** (2001) The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development* 128: 4251-4264
- Bach AS, Enjalbert S, Comunale F, Bodon S, Vitale N, Charasse S, Gauthier-Rouvière C** (2010) ARF6 regulates mammalian myoblast fusion through PLD1 and PI(4,5)P2 signaling pathways (ahead of print)
- Bader MF, Vitale N.** (2009) Phospholipase D in calcium-regulated exocytosis: lessons from chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1791(9): 936-41
- Bahri SM, Choy JM, Manser E, Lim L, Yang, X** (2009) The *Drosophila* homologue of Arf-GAP GIT1, dGIT, is required for proper muscle morphogenesis and guidance during embryogenesis. *Dev Biol* 325: 15-23
- Balagopalan L, Chen MH, Geisbrecht ER, Abmayr SM** (2006) The CDM Superfamily Protein MBC Directs Myoblast Fusion through a Mechanism That Requires Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate Binding but Is Independent of Direct Interaction with DCrk. *MOL CELL BIOL* 26 (24): 9442–9455
- Balasubramanian N, Scott DW, Castle JD, Casanova JE, Schwartz MA** (2007) Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat Cell Biol* 9(12):1381-91.
- Balch WE, Kahn RA, Schwaninger R** (1992) ADP-ribosylation factor is required for vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and the cis-Golgi compartment *J Biol Chem*. 267(18):13053-61.
- Bao S, Fischbach KF, Corbin V, Cagan RL.**(2010) Preferential adhesion maintains separation of ommatidia in the *Drosophila* eye. *Dev Biol*. [Epub ahead of print]
- Bate M** (1990) The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* 110: 791-804
- Bate M** (1993) The mesoderm and its derivatives. In: Bate. M, Martinez-Arias, A. (Eds.), *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Press, NY, pp. 1013-1090
- Baylies MK and Bate, M** (1996) *twist*: A myogenic switch in *Drosophila*. *Science* 272: 1481-1484
- Baylies MK, Bate M, Ruiz-Gomez M** (1998) Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell* 93: 921-927
- Beall EL, Rio DC** (1997) *Drosophila* P-element transposase is a novel site-specific endonuclease. *Genes Dev*. 11(16):2137-51.
- Beck R, Ravet M, Wieland FT, Cassel D** (2009) The COPI system: Molecular mechanisms and function. *FEBS Letters* 583: 2701–2709
- Beckett K & Baylies MK** (2007) 3D analysis of founder cell and fusion competent myoblast arrangements outlines a new model of myoblast fusion. *Dev Biology* 30: 113–125
- Ben-Yaacov S, Le Borgne R, Abramson I, Schweisguth F, Schejter ED** (2001) Wasp, the *Drosophila* Wiskott-Aldrich syndrome gene homologue, is required for cell fate decisions mediated by Notch signaling. *J Cell Biol*. 152(1):1-13.
- Béraud-Dufour S, Robineau S, Chardin P, Paris S, Chabre M, Cherfils J, Antonny B** (1998) A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *EMBO J*. 17(13):3651-9.
- Bernards A** (2003) GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta*. 1603(2):47-82.
- Berger S, Schäfer S, Kesper DA, Holz A., Eriksson T, Palmer RH, Beck L, Klämbt C, Renkawitz-Pohl R, Önel SF** (2008) WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. *J Cell Sci* 121: 1303-1313
- Bhuin T & Roy JK** (2009) Rab11 is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Cell Tissue Research*. 336(3): 489-99
- Billuart P, Winter CG, Maresh A, Zhao X, Luo L** (2001) Regulating axon branch stability: the role of p190 RhoGAP in repressing a retraction signaling pathway. *Cell*. 107(2): 195-207

- Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K.** (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(9): 3312-7.
- Boeckel C & Brown NH** (2002) Integrins in Development: Moving on, Responding to, and Sticking to the Extracellular Matrix. *Dev Cell* 3: 311–321
- Bonifacino, JS** (2004) The GGA proteins: Adaptors on the move. *Nature Reviews*, 5: 23-31
- Boschert U, Ramos RG, Tix S, Technau GM, Fischbach KF** (1990) Genetic and developmental analysis of irreC, a genetic function required for optic chiasm formation in *Drosophila*. *J Neurogenet*. 6(3):153-71.
- Boshans RL, Szanto S, van Aelst L, D'Souzo-Schorey** (2000) ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol. Cell. Biol*. 20: 3685–3694
- Bothe I & Baylies MK** (2010) The Role of PIP2 in *Drosophila* Myoblast Fusion. 51th Annual *Drosophila Research conference*
- Bour BA, Chakravarti M, West JM, Abmayr SM** (2000) *Drosophila* Sns, a member of the immunoglobulin Superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Devel*. 14: 1498-1511
- Bour BA, O'Brien MA, Lockwood WL, Goldstein ES, Bodmer R, Taghert PH, Abmayr SM, Nguyen HT** (1995) *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Devel*. 9: 730-741
- Brabant MC, Brower DL.** (1993) PS2 integrin requirements in *Drosophila* embryo and wing morphogenesis. *Dev Biol*. 157(1):49-59.
- Bagrodia S, Bailey D, Lenard Z, Hart M, Guan JL, Premont RT, Taylor SJ, Cerione RA** (2004) A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *J Biol Chem*. 274(32): 22393-400
- Brand AH and Perrimon N** (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415
- Brown HA, Gutowski S, Moomaw CR, Slaughter C, Sternweis PC** (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein stimulates phospholipase D activity. *Cell*. 75: 1137-1144
- Brown NH** (2000) Cell-cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm. *Matrix Biol* 19:191-201
- Brown MC, West KA, Turner CE** (2002) Paxillin-dependent paxillin kinase linker and p21-activated kinase localization to focal adhesions involves a multistep activation pathway *Mol Biol Cell*. 13(5):1550-65.
- Bulchand S, Menon SD, George SD, Chia W** (2010) The Intracellular Domain of Dumbfounded Affects Myoblast Fusion Efficiency and Interacts with Rolling Pebbles and Loner. *PLOS One*, Vol 5(2): e9374
- Buttgereit D, Paululat A, Renkawitz-Pohl R** (1996) Muscle development and attachment to the epidermis is accompanied by the expression of beta 3 and beta 1 tubulin isoforms, respectively. *Int. J. Dev. Biol*. 40: 189-196
- Campa F, Randazzo PA** (2008) Arf GTPase-activating proteins and their potential role in cell migration and invasion. *Cell Adh Migr*. 2(4):258-62.
- Callahan CA, Bonkovsky JL, Scully AL, Thomas JB** (1996) *derailed* is required for muscle attachment site selection in *Drosophila*. *Development*. 122(9):2761-7.
- Carmena A, Bate M, Jimenez F.** (1995) *lethal of scute*, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Devel*. 9:2373-2383
- Carmena A, Gisselbrecht S, Harrison J, Jimenez F, Michelson AM** (1998a) Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes & Dev* 12: 3910-3922
- Carmena A, Murugasu-Oei B, Menon D, Jimenez F, Chia W** (1998b) *inscutable* and *numb* mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Devel*. 12: 304-315
- Casanova JE** (2007) Regulation of Arf Activation: the Sec7 Family of Guanine Nucleotide Exchange Factors. *Traffic* 8: 1476–1485
- Chardin P, Paris S, Antonny B, Robineau S, Béraud-Dufour S, Jackson CL, Chabre M** (1996) A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 384: 481 – 484
- Chen JL, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Stamnes M** (2004) Cytosol-derived proteins are sufficient to for Arp2/3 recruitment and Arf/coatamer-dependent actin polymerization on the Golgi membranes. *FEBS letters* 566: 281-286
- Chen EH and Olson EN** (2001) Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell* 1: 705-715
- Chen EH, Pryce BA, Tzeng JA, Gonzalez GA, Olson EN.** (2003) Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, Loner, and its effector ARF6. *Cell* 114: 751-762
- Chen GC, Lee JY, Tang HW, Debnath J, Thomas SM, Settlemann J** (2008) Genetic interactions between *Drosophila melanogaster* Atg1 and paxillin reveal a role for paxillin in autophagosome formation. *Autophagy*. 4(1): 37-45.

- Chen GC, Turano B, Ruest PJ, Hagel M, Settleman J, Thomas SM** (2005) Regulation of Rho and Rac signaling to the actin cytoskeleton by paxillin during *Drosophila* development. *Mol Cell Biol.* 25(3): 979-87.
- Chou TB, Perrimon N** (1996) The Autosomal FLP-DFS Technique for Generating Germline Mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144: 1673-1679
- Ciruela F** (2008) Fluorescence-based methods in the study of protein-protein interactions in living cells. *Cur Op Biotechn* 19:338-343
- Cockcroft S, Way G, O'Luanaigh N, Pardo R, Sarri E, Fensome A** (2001) Signalling role for ARF and phospholipase D in mast cell exocytosis stimulated by crosslinking of the high affinity FcεR1 receptor. *Mol Imm* 38 (2001) 1277-1282
- Cockcroft S, Thomas GMH, Fensome A, Geny B, Cunningham E, Gout I, Hiles I, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ** (1994) Phospholipase D: A Downstream Effector of ARF in Granulocytes. *SCIENCE VOL.* 263
- Cockcroft S** (2009) Phosphatidic acid regulation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1791(9):905-12
- Cohen EH, Mariol MC, Wallace RMH, Weyers J, Kamberov YG, Pradel J, Wilder EL** (2007) *DWnt4* Regulates Cell Movement and Focal Adhesion Kinase during *Drosophila* Ovarian Morphogenesis. *Dev Cell*, 2: 437-448
- Cox R, Mason-Gamer RJ, Jackson CL, Segev N.** (2004) Phylogenetic analysis of Sec7-domain-containing Arf nucleotide exchangers. *Mol Biol Cell.* 2004 Apr;15(4):1487-505
- Craig AM, Wyborski RJ, Banker** (1995). Preferential addition of newly synthesized membrane protein at axonal growth cones. *Nature* 375, 592-594
- Cripps RM, Black BL, Zhao B, Lien CL, Schulz RA, Olson EN** (1998) The myogenic regulatory gene *mef2* is a direct target for transcriptional activation by Twist during *Drosophila* myogenesis. *Genes Devel.* 12: 422-434
- Cukierman E, Huber I, Rotman M, Cassel D.** (1995) The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science.* 270(5244): 1999-2002
- Damm C, Wolk A, Buttgereit D, Löher K, Wagner E, Lilly B, Olson EN, Hasenpusch-Theil K, Renkawitz-Pohl R** (1998) Independent regulatory elements in the upstream region of the *Drosophila* $\beta 3$ -tubulin gene (*β Tub60D*) guide expression in the dorsal vessel and somatic muscles. *Devel. Biol* 199: 138-149
- Dascher C, Balch WE** (1994) Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 269(2): 1437-48.
- Deakin & Turner** (2008) Paxillin comes of age. *J Cell Sci* 121: 2435-2444
- Del Pozo MA, Kiosses WB, Alderson NB, Meller N, Hahn KM, Schwartz MA** (2002) Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat. Cell Biol.* 4: 232-239
- Derrien V, Couillault C, Franco M, Martineau S, Montcourrier P, Houlgatte R, Chavrier P** (2002) A conserved C-terminal domain of EFA6-family ARF6-guanine nucleotide exchange factors induces lengthening of microvilli-like membrane protrusions. *J Cell Sci* 115: 2867-2879
- Di Cesare A, Paris S, Albertinazzi C, Dariozzi S, Andersen J, Mann M, Longhi R, de Curtis I.** (2000) p95-APP1 links membrane transport to Rac-mediated reorganization of actin. *Nat Cell Biol.* 2(8): 521-30.
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su K, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblaue S, Couto A, Marra V, Keleman K, Barry JD** (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448: 151-157
- Doberstein SK, Fetter R, Mehta AY, Goodman CS** (1997) Genetic analysis of myoblast fusion: *blown fuse* is required for progression beyond the prefusion complex. *J. Cell Biol* 136, 1249-126
- Doherty KR, Demonbreun AR, Wallace GQ, Cave A, Posey AD, Heretis K, Pytel P, McNally EM** (2008) The endocytic recycling protein EHD2 interacts with myoferlin to regulate myoblast fusion. *J Biol Chem.* 283(29): 20252-60.
- Donaldson JG** (2003) Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 278, 41573-41576
- Donaldson JG** (2005) Multiple activities for Arf1 at the Golgi complex. *Bioch et Biophys Acta* 1744, 364- 373
- Donaldson JG and Honda A** (2005) Localization and function of Arf family GTPases. *Bioch Society Trans* 33: 639-642
- Donaldson JG and Jackson JL** (2000) Regulators and effectors of the Arf GTPases. *Curr. Op. Cell Biol.* 12: 475-482
- D'Souza-Schorey C and Chavrier P** (2006) Arf proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 347-358
- Duan H, Skeath JB, Nguyen HT** (2001) *Drosophila* Lameduck, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development* 128: 4489-4500

- Dunphy JL, Moravec R, Ly K, Lasell TK, Melancon P, Casanova JE** (2006) The Arf6 GEF GEP100/BRAG2 Regulates Cell Adhesion by Controlling Endocytosis of $\beta 1$ Integrins. *Curr Biol* 16: 315–320
- Dworak HA, Charles MA, Pellerano LB, Sink H** (2001) Characterization of *Drosophila* Hibris, a gene related to human nephrin. *Development* 128: 4265–4276
- Dyer N, Rebollo E, Dominguez P, Elkhatib N, Chavrier P, Daviet L, González C, González-Gaitán M** (2007) Spermatocyte cytokinesis requires rapid membrane addition mediated by Arf6 on central spindle recycling endosomes. *Development* 134: 4437–4447
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV** (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418: 790–793
- Erickson MRS, Galetta BJ, Abmayr SM** (1997) *Drosophila myoblast city* encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure and cytoskeletal organization. *J. Cell Biol.* 138: 589–603
- Estrada B, Choe SE, Gisselbrecht SS, Michaud S, Raj L, Busser BW, Halfon MS, Church GM, Michelson AM** (2006) An Integrated Strategy for Analyzing the Unique Developmental Programs of Different Myoblast Subtypes. *PLoS Genet* 2(2): e16
- Fischbach KF, Linneweber GA, Andlauer TF, Hertenstein A, Bonengel B, Chaudhary K** (2009) The Irre Cell Recognition Module (IRM) Proteins. *J Neurogenet.* 23(1-2): 48–67
- Franco M, Peters PJ, Boretto J, van Donselaar E, Neri A, D'Souza-Schorey C, Chavrier P** (1999) EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for Arf6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *EMBO J.* 18: 1480–1491
- Frank SR, Adelstein MR, Hansen SH** (2006) GIT2 represses Crk- and Rac1-regulated cell spreading and Cdc42-mediated focal adhesion turnover. *EMBO J.* 25(9): 1848–59.
- Frank SR, Hatfield JC, Casanova JE** (1998) Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol Biol Cell.* 9(11): 3133–46
- Frasch M, and Nguyen HT** (1999) Genetic control of mesoderm patterning and differentiation during *Drosophila* embryogenesis. *Adv. Devel. Biochem.* 5: 1–47
- Friedlander J & Brown NH** (2009) Vesicular transport, actin reorganisation and ECM adhesion: Git as a hub. 21st *European Drosophila Research Conference*, 2009
- Fritz JL and VanBerkum MF** (2000) Calmodulin and son of sevenless dependent signaling pathways regulate midline crossing of axons in the *Drosophila* CNS. *Development.* 127(9): 1991–2000.
- Furlong EEM, Andersen EC, Null E, White K, Scott MP** (2001) Patterns of Gene Expression During *Drosophila* Mesoderm Development. *Science* 293: 1629–1633
- Galetta BJ, Chakravarti M, Banerjee R, Abmayr SM** (2004) SNS: adhesive properties, localization requirements and ectodomain, dependence in S2 cells and embryonic myoblasts. *Mech of Dev* 121: 1455–68
- Gaynor EC, Chen CY, Emr DR, Graham TD** (1998) ARF Is Required for Maintenance of Yeast Golgi and Endosome Structure and Function. *Mol Biol Cell* Vol 9: 653–670
- Geisbrecht ER, Haralalka S, Swanson SK, Florens L, Washburn MP, Abmayr SM** (2008) *Drosophila* ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization. *Dev Biol* 314: 137–149
- Gildor B, Massarwa R, Shilo BZ, Schejter, ED** (2009) The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate *Drosophila* myoblast fusion. *EMBO Rep* 10: 1043–1050
- Gillingham AK & Munro S** (2007) The Small G Proteins of the Arf Family and Their Regulators. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* Vol 23: 579–611
- Goldberg J** (1998) Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell.* 95(2): 237–48.
- Goldberg J** (1999) Structural and Functional Analysis of the ARF1–ARFGAP Complex Reveals a Role for Coatomer in GTP Hydrolysis. *Cell*, Vol. 96: 893–902
- Grillo-Hill BK & Wolff T** (2009) Dynamic Cell Shapes and Contacts in the Developing *Drosophila* Retina Are Regulated by the Ig Cell Adhesion Protein Hibris. *Dev Dynamics* 238:2223–2234
- Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP** (2004) Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage ϕ C31. *Genetics.* 166(4): 1775–82
- Groth V** (2008) Identifizierung von Schizo-Interaktionspartnern mit Hilfe eines 2-Hybrid-Screens und einem Modifizier-Screen im Auge von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit
- Gupta GD, MG S, Kumari S, Lakshminarayan R, Dey G, Mayor S** (2009) Analysis of Endocytic Pathways in *Drosophila* Cells Reveals a Conserved Role for GBF1 in Internalization via GEECs. *PLoS ONE* 4(8): e6768.

- Hakeda-Suzuki S, Ng J, Tzu J, Dietzl G, Sun Y, Harms M, Nardine T, Luo L, Dickson BJ** (2002) Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* 416: 438-442
- Haralalka S, Abmayr SM** (2010) Myoblast fusion in *Drosophila*. *Exp Cell Res.* [Epub ahead of print]
- Harden N, Lee J, Loh HY, Ong YM, Tan I, Leung T, Manser E, Lim L** (2006) A *Drosophila* homolog of the Rac- and Cdc42-activated serine/threonine kinase PAK is a potential focal adhesion and focal complex protein that colocalizes with dynamic actin structures. *Mol Cell Biol.* 16(5): 1896-908.
- He X, Fang X, Emoto K, Jan YN, Adler P** (2005) The Tricornered Ser/Thr Protein Kinase Is Regulated by Phosphorylation and Interacts with Furry(during *Drosophila* Wing Hair Development. *Mol Biol Cell* 16: 689–700
- Hicks MS, O'Leary V, Wilkin M, Bee SE, Humphries MJ, Baron M** (2001). DrhoGEF3 encodes a new *Drosophila* DH domain protein that exhibits a highly dynamic embryonic expression pattern. *Dev. Genes Evol.* 211(5): 263-7
- Higgs HN, Pollard TD** (2001) Regulation of actin filament network formation through Arp2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem.* 70: 649-76
- Hiroi T, Someya A, Thompson W, Moss J, Vaughan M** (2006) GEP100/BRAG2: Activator of ADP-ribosylation factor 6 for regulation of cell adhesion and actin cytoskeleton via E-cadherin and alpha catenin. *PNAS* 103(28): 10672–10677
- Hoefen RJ & Berk BC** (2009) The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci* 119: 1469-1475
- Hofer, I** (2010) The role of the Arf-GAP D-git during *Drosophila* muscle guidance. Bachelorarbeit
- Hofmann C, Shepelev M and Chernoff J** (2004). The genetics of Pak. *J Cell Sci.* 117: 4343-4354
- Hudry B, Graba Y, Merabet S** (2009) Visualization of multiple protein interactions in living *Drosophila* embryos using multicolour fluorescence complementation assay. 21st *European Drosophila Research Conference*, 2009
- Hummel T, Schimmelpfeng K, Klämbt C** (1999) Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*: Function of the different midline cells. *Development* 126: 771-779
- Innocenti M, Zucconi A, Disanza A et al** (2004) Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* 6: 319–327
- Inoue, H and Randazzo, PA** (2007) Arf GAPs and Their Interacting Proteins. *Traffic* 8: 1465–1475
- Ismail AM, Padrick SB, Chen B, Umetani J, Rosen MK** (2009) The WAVE regulatory complex is inhibited. *Nat Struct Mol Biol.* 16(5):561-3.
- Iwai Y, Usui T, Hirano S, Steward R, Takeichi M, Uemura T** (1997) Axon Patterning Requires DN-cadherin, a Novel Neuronal Adhesion Receptor, in the *Drosophila* Embryonic CNS. *Neuron* 19: 77–89
- Jackson CL and Casanova JE** (2000) Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide exchange factors. *trends in cell biol* Vol. 10: 60-67
- Jones DH, Morris JB, Morgan CP, Kondo H, Irvine RF, Cockcroft S** (2000) Type I PIP 5-kinase directly interacts with ARF1 and is responsible for PI(4,5)P₂ synthesis in the Golgi compartment. *J. Biol.Chem.* 275: 13962–66.
- Kahn RA, Gilman AG** (1986) The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem.* 261(17):7906-11.
- Kawasaki M, Nakayama K, Wakatsuk S** (2005) Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. *Current Opinion in Structural Biology* 15:681–689
- Kesper DA, Stute C, Buttgerit D, Kreisköther N, Vishnu S, Fischbach KF, Renkawitz-Pohl R** (2007) Myoblast Fusion in *Drosophila melanogaster* is mediated through a Fusion-Restricted-Myogenic-Adhesive structure (FuRMAS). *Dev Dyn.* 236: 404-415
- Kim S, Shilagardi K, Zhang S, Hong, SN; Sens, KL; Bo, J; Gonzalez, GA; Chen, EH** (2007) A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of pre-fusion vesicles during myoblast fusion. *Dev Cell* 12: 571-586
- Kim S, Ko J, Shin H, Lee JR, Lim C, Han JH, Altrock WD, Garner CC, Gundelfinger ED, Premont RT, Kaang BK, Kim E** (2003) The GIT family of proteins forms multimers and associates with the presynaptic cytomatrix protein Piccolo. *J Biol Chem.* 278(8): 6291-300.
- Kim S, Lee SH, Park D** (2001). Leucine zipper-mediated homodimerization of the p21-activated Kinase-interacting factor, β Pix. Implication for a role in cytoskeletal reorganization. *J. Biol. Chem.* 276: 10581-84.
- Klaus ES** (2008) Erzeugung einer Mutation in der *Drosophila* Arf-GAP Gen *git* und deren phänotypische sowie molekulare Analyse. Staatsexamensarbeit.
- Knight B, Laukaitis C, Akhtar N, Hotchin NA, Edlund M, Horwitz AR** (2000) Visualizing muscle cell migration in situ. *Curr Biol.* 10(10): 576-85.

- Kocherlakota KS, Wu JM, McDermott J, Abmayr S** (2008) Analysis of the cell adhesion molecule Sticks-and-Stones reveals multiple redundant functional domains, protein-interaction motifs and phosphorylated Tyrosines that direct myoblast fusion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 178: 1371–1383
- Kon S, Tanabe K, Watanabe T, Sabe H, Satake M** (2008) Clathrin dependent endocytosis of E-cadherin is regulated by the Arf6GAP isoform SMAP1. *Exp Cell Res* 314(7): 1415–28.
- Krauss RS, Cole F, Gaio U, Takaesu G, Zhang W, Kang JS** (2005) Close encounters: regulation of vertebrate skeletal myogenesis by cell-cell contact. *J Cell Sci* 2118: 2355–2362
- Kraynov VS, Chamberlain C, Bokoch GM, Schwartz MA, Slabaugh S, Hahn KM** (2000) Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 290: 333–337
- Kreisköther N, Reichert N, Buttgerit D, Hertenstein A, Fischbach KF, Renkawitz-Pohl R** (2006) *Drosophila* Rolling pebbles colocalises and putatively interacts with alpha-Actinin and the SIs isoform Zormin in the Z-discs of the sarcomere and with Dumbfounded/Kirre, alpha-Actinin and Zormin in the terminal Z-discs. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 27: 93–106
- Kumari S, Mayor S** (2008) ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. *Nat Cell Biol* 10: 30–41
- Langille SE, Patki V, Klarlund JK, Buxton JM, Holik JJ, Chawla A, Corvera S, Czech MP** (1999) ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. *J Biol Chem* 274(38): 27099–104
- Lebensohn AM, Kirschner MW** (2009) Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell* 36(3): 512–24
- Lemmon MA, Ferguson KM** (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* 15: 3501–18
- Lemmon MA** (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 9: 99–111
- Levin TP & Munro S** (2002) Targeting of Golgi-Specific Pleckstrin Homology Domains Involves Both PtdIns 4-Kinase-Dependent and -Independent Components *Current Biol* 12: 695–704
- Liang JO, Kornfeld S** (1997) Comparative activity of ADP-ribosylation factor family members in the early steps of coated vesicle formation on rat liver Golgi membranes *J Biol Chem* 272(7):4141–8.
- Lilly B, Galewsky S, Firulli AB, Schulz RA, Olson EN** (1994) D-Mef2: A MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis. *PNAS USA* 91: 5662–66
- Loo TH, Ng YW, Lim L, Manser E** (2004) GIT1 activates p21-activated kinase through a mechanism independent of p21 binding. *Mol. Cell. Biol.* 24, 3849–3859
- Lundmark R, Doherty GJ, Vallis Y, Peter BJ, McMahon HT** (2008) Arf family GTP loading is activated by, and generates, positive membrane curvature *Biochem J* 414(2):189–94
- Luo L, Liao YJ, Jan LY, Jan YN** (1994) Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Devel* 8: 1787–1802
- Macia E, Chabre M, Franco M** (2001) Specificities for the Small G Proteins ARF1 and ARF6 of the Guanine Nucleotide Exchange Factors ARNO and EFA6. *J Biol Chem* 276 (27): 24925–24930
- Macia E, Partisani M, Favard C, Mortier E, Zimmermann P, Carlier MF, Gounon P, Luton F, Franco M** (2008) The Pleckstrin Homology Domain of the Arf6-specific Exchange Factor EFA6 Localizes to the Plasma Membrane by Interacting with Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate and F-actin. *J Biol Chem* 283(28): 19836–44
- Madziva TM, Birnbaumer M** (2006) A role for Arf6 in the processing of G-Protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 281(17): 12178–86
- Mandiyan V, Andreev J, Schlessinger J, Hubbard SR** (1999) Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein. *EMBO J* 18: 6890–98
- Massarwa R, Carmon S, Shilo BZ, Schejter ED** (2007) WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell* 12: 557–569
- Matafora V, Paris S, Dariozzi S, de Curtis I** (2001) Molecular mechanisms regulating the subcellular localization of p95-APP1 between the endosomal recycling compartment and sites of actin organization at the cell surface. *J Cell Sci* 114: 4509–20
- Matas OB, Martinez-Menarguez JA, Egea G** (2004) Association of Cdc24/N-Wasp/Arp2/3 signaling with golgi membranes. *Traffic* 5: 838–846
- Maqbool T, Jagla K** (2007) Genetic control of muscle development: learning from *Drosophila*. *J Muscle Res Cell Motil* 28: 397–407

- Mazaki Y, Hashimoto S, Okawa K, Tsubouchi A, Nakamura K, Yagi R, Yano H, Kondo A, Iwamatsu A, Mizoguchi A, Sabe H** (2001) An ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Git2-short/KIAA0148 is involved in subcellular localization of paxillin and actin cytoskeletal organization. *Mol Biol Cell*. 12(3): 645-62.
- Meller N, Merlot S, Guda C** (2005) CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *J Cell Sci* 118: 4937-4946
- Menon SD & Chia W** (2001) *Drosophila* rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded. *Dev Cell*. 1(5): 691-703.
- Menon SD, Osman Z, Chenchill K, Chia W** (2005) A positive feedback loop between Dumbfounded and Rolling pebbles leads to myotube enlargement in *Drosophila*. *J Cell Biol*, 169(6): 909-920
- Meyer T** (2009) Immunhistochemische und biochemische Analysen zur Interaktion von Schizo und N-Cadherin und deren Bedeutung für die Entwicklung der Muskulatur in *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit
- Miki H & Takenawa T** (2003) Regulation of Actin Dynamics by WASP Family Proteins. *J. Biochem.* 134: 309-313
- Miura K, Nam JM, Kojima C, Mochizuki N, Sabe H** (2009) EphA2 engages Git1 to suppress Arf6 activity modulating epithelial cell-cell contacts. *Mol Biol Cell*. 20(7): 1949-59
- Morishige M, Hashimoto S, Ogawa E, Toda Y, Kotani H, Hirose M, Wei S, Hashimoto A, Yamada A, Yano H, Mazaki Y, Kodama Y, Nio Y, Manabe T, Wada H, Kobayashi H, Sabe H** (2008) GEP100 links epidermal growth factor receptor signaling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nature Cell Biol* 10(1) 85-92
- Mossessova E, Gulbis JM, Goldberg J** (1998) Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human Arp2/3 and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell*. 92(3):415-23.
- Myers KR & Casanova JE** (2008) Regulation of actin cytoskeleton dynamics by Arf-family GTPases. *Trends in Cell Biology* 18(4): 184-192
- Natsume W, Tanabe K, Kon S, Yoshida N, Watanabe T, Torii T, Satake M.**(2006) SMAP2, a novel ARF GTPase-activating protein, interacts with clathrin and clathrin assembly protein and functions on the AP-1-positive early endosome/trans-Golgi network. *Mol Biol Cell*. 17(6): 2592-603
- Ng J, Nardine T, Harms M, Tzu J, Goldstein A, Sun Y, Dietzl G, Dickson BJ, Luo L** (2002) Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature*. 416(6879): 442-7.
- Nie Z & Randazzo PA** (2006) Arf GAPs and membrane traffic. *J Cell Sci* 119: 1203-1211
- Nishiya N, Kiosses WB, Han J, Ginsberg MH** (2005) An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nat Cell Biol*.7(4): 343-52
- Nolan KM, Barrett K, Lu Y, Hu KQ, Vincent S, Settleman J** (1998) Myoblast City, the *Drosophila* homolog of Dock180/Ced-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes Devel*. 12: 3337-3342
- Nose A, Isshiki T, Takeichi M** (2008) Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the msh homeobox gene. *Development*. 125(2): 215-23
- Nowak SJ, Nahirney PC, Hadjantonakis AK, Baylies MK** (2009) Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. *J Cell Sci*. 122: 3282-93
- Önel SF** (2009) Actin regulators take the reins in *Drosophila* myoblast fusion. *Cent Eur J Biol* 4: 11-18
- Önel S, Bolke L, Klämbt C** (2004) The *Drosophila* ARF-GEF Schizo controls commissure formation by regulating Slit. *Development* 131: 2587-2594
- Önel SF, Renkawitz-Pohl R** (2009) FuRMAS: triggering myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Dyn* 238:1513-25
- Önel SF, Dottermusch C, Sickmann A, Buttgerit D, Renkawitz-Pohl R** (2010) Role of the actin cytoskeleton within FuRMAS during *Drosophila* myoblast fusion and first functionally conserved factors in vertebrates. in "Cell Fusions: Regulation and Control" ed Lars-Inge Larsson, Springer-Verlag, Berlin
- Pacheco-Rodriguez G, Meacci E, Vitale N, Moss J, Vaughan M** (1998) Guanine Nucleotide Exchange on ADP-ribosylation Factors Catalyzed by Cytohesin-1 and Its Sec7 Domain. *J Biol Chem* 273(41) 26543-48
- Packard M, Koo ES, Gorczyca M, Sharpe J, Cumberledge S, Budnik V** (2002) The *Drosophila* Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- and postsynaptic differentiation. *Cell*. 111(3):319-30.
- Pajcini KV, Pomerantz JH, Alkan O** (2008) Myoblasts and macrophages share molecular components that contribute to cell-cell fusion. *J Cell Biol* 180: 1005-1019
- Paris S, Béraud-Dufour S, Robineau S, Bigay J, Antonny B, Chabre M, Chardin P** (1997) Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno. *J Biol Chem*. 272(35): 22221-6
- Paris S, Longhi R, Santambrogio P, de Curtis I** (2003) Leucine-zipper-mediated homo- and heterodimerization of GIT family p95-ARF GTPase-activating protein, PIX-, paxillin-interacting proteins 1 and 2. *Biochem J*. 372: 391-8

- Parks AL, Cook KR, Belvin M, Dompe NA, Fawcett R, Huppert K, Tan LR, Winter CG, Bogart KP, Deal JE, Deal-Herr ME, Grant D, Marcinko M, Miyazaki WY, Robertson S, Shaw KJ, Tabios M, Vysotskaia V, Zhao L, Andrade RS, Edgar KA, Howie E, Killpack K, Milash B, Norton A, Thao D, Whittaker K, Winner MA, Friedman L, Margolis J, Singer MA, Kopczynski C, Curtis D, Kaufman TC, Plowman GD, Duyk G, Francis-Lang HL (2004) Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet.* 36(3): 288-92
- Patel FB, Bernadskaya YY, Chen E, Jobanputra A, Pooladi Z, Freeman KL, Gally C, Mohler WA, Soto MC. (2008) The WAVE/SCAR complex promotes polarized cell movements and actin enrichment in epithelia during *C. elegans* embryogenesis. *Dev Biol.* 324(2): 297-309
- Peyroche A, Antonny B, Robineau S, Acker S, Cherfils S, Jackson CL (1999) Brefeldin A Acts to Stabilize an Abortive ARF-GDP-Sec7 Domain Protein Complex: Involvement of Specific Residues of the Sec7 Domain. *Molecular Cell* 3: 275-285
- Pirrota, V (1988) Vectors for P-mediated transformation in *Drosophila*. *Biotechnology.* 10: 437-456.
- Poon PP, Nothwehr SF, Singer RA, Johnston GC (2001) The Gcs1 and Age2 ArfGAP proteins provide overlapping essential function for transport from the yeast trans-Golgi network. *J Cell Biol.* 155(7): 1239-50
- Premont RT, Perry SJ, Schmalzigang R, Roseman JT, Xing Y, Claing A (2004) The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cell Signal.* 16(9): 1001-11
- Prokop A, Martín-Bermudo MD, Bate M, Brown NH (1998) Absence of PS integrins or laminin A affects extracellular adhesion, but not intracellular assembly, of hemiadherens and neuromuscular junctions in *Drosophila* embryos. *Dev Biol* 196(1): 58-76
- Radhakrishna H, Al-Awar O, Khachikian Z, Donaldson JG (1999) ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *J. Cell Sci.* 112, 855-866
- Ramos RG, Igloi GL, Licht B, Baumann U, Maier D, Schneider T, Brandstatter JH, Frohlich A, Fischbach KF (1993) The irregular chiasm C-roughest locus of *Drosophila*, which affects axonal projections and programmed cell death, encodes a novel ig-like protein. *Genes Devel.* 7: 2533-47
- Randazzo PA, Inoue H, Bharti S (2007) Arf GAPs as regulators of the actin cytoskeleton. *Biol. Cell* (2007) 99, 583-600
- Randazzo PA, Hirsch DS (2004) Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cell Signal.* 16(4): 401-13.
- Ranganayakulu G, Zhao B, Dokidis A, Molkentin JD, Olson EN (1995) A series of mutations in the D-Mef2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Devel Biol.* 171: 169-181
- Rankovic M, Jacob L, Rankovic V, Brandenburg LO, Schröder H, Höllt V, Koch T (2009) ADP-ribosylation factor 6 regulates mu-opioid receptor trafficking and signaling via activation of phospholipase D2. *Cell Signal.* 21(12): 1784-93
- Raghu P, Coessens E, Manifava M, Georgiev P, Pettitt T, Wood E, Garcia-Murillas I, Okkenhaugm H, Trivedi D, Zhang Q, Razzaq A, Zaid O, Wakelam M, O'Kane CJ, Ktistakis N (2009) Rhabdomere biogenesis in *Drosophila* photoreceptors is acutely sensitive to phosphatidic acid levels. *J. Cell Biol.* 185(1): 129-145
- Rau A, Buttgerit D, Holz A, Fetter R, Doberstein SK, Paululat A, Staudt N, Skeath J, Michelson AM, Renkawitz-Pohl, R (2001) *rolling pebbles (rols)* is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development* 128: 5061-5073
- Reeves N, Posakony JW (2005) Genetic programs activated by proneural proteins in the developing *Drosophila* PNS. *Dev Cell.* 8(3): 413-25
- Reiter C, Schimansky T, Nie Z, Fischbach, KF (1996) Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: the role of the IrreC-rst protein. *Development* 122: 1931-1940
- Ren R, Nagel M, Tahinci E, Winklbauer R, Symes K (2006) Migrating anterior mesoderm cells and intercalating trunk mesoderm cells have distinct responses to Rho and Rac during *Xenopus* gastrulation. *Dev Dyn.* 235(4): 1090-9.
- Renault L, Guibert B, Cherfils J (2003) Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* 426: 525-530
- Rhoads AR & Friedberg F (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *The FASEB Journal* 11: 331-40
- Richardson BE, Beckett K, Nowak SJ, Baylies MK (2007) SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* 134:4357-4367
- Richardson BE, Beckett K, Baylies MK (2008a) Live imaging of *Drosophila* myoblast fusion. *Methods Mol Biol* 475:263-274

- Richardson BE, Nowak SJ, Baylies MK** (2008b) Myoblast Fusion in Fly and Vertebrates: New Genes, New Processes and New Perspectives. *Traffic* 9:1050–1059
- Riechmann V, Irion U, Wilson R, Grosskortenhaus R, Leptin M** (1997) Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development* 124: 2915–2922
- Robineau S, Chabre M, Antonny B** (2000) Binding site of brefeldin A at the interface between the small G protein ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and the nucleotide-exchange factor Sec7 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*;97(18): 9913–8
- Robinson MS** (2004) Adaptable adaptors for coated vesicles. *TRENDS Cell Biol* 14 (4): 167–174
- Rochlin K, Yu S, Roy S, Baylies MK** (2009) Myoblast fusion: When it takes more to make one. *Dev Biol.* 20
- Roth MG** (2004) Phosphoinositides in Constitutive Membrane Traffic. *Physiol Rev* 84: 699–730
- Roth MG** (2008) Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic* 9(8):1233–9
- Rubin, GM & Spradling, AC** (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science.* 218: 348–353
- Ruiz-Gomez M, Coutts N, Price A, Taylor M, Bate M** (2000) *Drosophila* Dumbfounded: A myoblast attractant essential for fusion. *Cell* 102:189–198
- Ruiz-Gomez M, Coutts N, Suster ML, Landgraf M, Bate M** (2002) myoblast incompetent encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*. *Development* 129:133–141
- Rushton E, Drysdale R, Abmayr AM, Michelson AM, Bate M** (1995) Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis in *Drosophila* muscle development. *Development* 121: 1979–1988
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*
- Sandmann T, Jensen LJ, Jakobsen JS, Karzynski MM, Eichenlaub MP, Bork P, Furlong EE** (2006) A temporal map of transcription factor activity: mef2 directly regulates target genes at all stages of muscle development. *Dev Cell.* (6): 797–807
- Sandmann T, Girardot C, Brehme M, Tongprasit W, Stolz V, Furlong EE.** (2007) A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 21(4): 436–49.
- Santy LC, Casanova JE** (2001) Activation of Arf6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipaseD. *J Cell Biol* 154: 599–610
- Santy LC, Ravichandran KS, Casanova JE** (2005) The Dock/ELMO-complex couples ARNO mediated Arf6 activation to the downstream activation of Rac1. *Curr. Biol.* 15: 1749–1754
- Sata M, Donaldson JG, Moss J, Vaughan M** (1998) Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange activity of Sec7 domain from yeast Sec7 with yeast and mammalian ADP ribosylation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4204–8
- Schäfer G, Weber S, Holz A et al** (2007) The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Biol* 304: 664–674
- Schenck A, Bardoni B, Langmann C, Harden N, Mandel JL, Giangrande A** (2003) CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron* 38(6): 887–98.
- Schlenker O, Rittinger K.**(2009) Structures of dimeric GIT1 and trimeric beta-PIX and implications for GIT-PIX complex assembly. *J Mol Biol.* 386(2): 280–9.
- Schnorrer, F & Dickson, BJ** (2004) Muscle Building: Mechanism of Myotube Guidance and Attachment Site Selection. *Devel. Cell* 7: 9–20
- Scholz R, Berberich S, Rathgeber L, Kollerker A, Köhr G, Kornau HC** (2010) AMPA Receptor Signaling through BRAG2 and Arf6 is Critical for Long-Term Synaptic Depression. *Neuron* 66: 768–780
- Schotman H, Karhinen L, Rabouille C** (2008) dGRASP-mediated noncanonical integrin secretion is required for *Drosophila* epithelial remodeling. *Dev Cell.* 14(2): 171–82.
- Schroeter R, Liehr S, Holz A, Bogdan S, Klämbt C, Beck L, Renkawitz-Pohl R** (2004) *kette* and *blown fuse* interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*. *Development* 131: 4501–4509
- Shelton C, Kocherlakota KS, Zhuang S, Abmayr SM** (2009) The immunoglobulin superfamily member Hbs functions redundantly with Sns in interactions between founder and fusion-competent myoblasts. *Development* 136: 1159–1168
- Skippen A, Jones DH, Morgan CP, Li M, Cockcroft S** (2002) Mechanism of ADP Ribosylation Factor-stimulated Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Synthesis in HL60 Cells. *J Biol Chem.* 277 (8) 5823–5831
- Someya A, Sata M, Takeda K, Pacheco-Rodriguez G, Ferrans VJ, Moss J, Vaughan M** (2001) Arf-GEP₁₀₀, a guanine nucleotide exchange protein for ADP-ribosylation factor 6. *PNAS* 98: 2413–2418

- Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf, Zerial, M** (2000) Distinct Membrane Domains on Endosomes in the Recycling Pathway Visualized by Multicolor Imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* 149(4): 901–913
- Spang A** (2002) ARF1 regulatory factors and COPI vesicle formation. *Curr Op Cell Biol* 14: 423–427
- Steffen A, Rottner K, Ehinger J, Innocenti M, Scita G, Wehland J, Stradal TE** (2004) Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* 23(4):749-59.
- Steller H & Pirrotta V** (1986) P transposons controlled by the heat shock promoter. *Mol Cell Biol.* 6: 1640-49.
- Strükelnberg M, Bonengel B, Moda LM, Hertenstein A, de Couet HG, Ramos RGP, Fischbach KF** (2001) *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle Development in *Drosophila*. *Development* 128: 4229-4239
- Stute C, Kesper D, Holz A, Buttgerit D, Renkawitz-Pohl R** (2006) Establishment of cell type specific Gal4-driver lines for the mesoderm of *Drosophila*. *D.I.S.* 89
- Suetsugu S, Murayama K, Sakamoto A, Hanawa-Suetsugu K, Seto A, Oikawa T, Mishima C, Shirouzu M, Takenawa T, Yokoyama S** (2006) The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *J Biol Chem.* 281(46): 35347-58.
- Takai Y, Kaibuchi K, Kikuchi A, Sasaki T** (1995) Effects of prenyl modifications on interactions of small G proteins with regulators. *Methods Enzymol.* 250: 122-33
- Takenawa T, Itoh T** (2001) Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1533(3):190-206.
- Takenawa T, Suetsugu S** (2007) The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(1): 37-48
- Tanabe K, Kon S, Natsume W, Torii T, Watanabe T, Satake M** (2006) Involvement of a novel ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, SMAP, in membrane trafficking: implications in cancer cell biology. *Cancer Sci.* 97(9): 801-6
- Tanabe K, Torii T, Natsume W, Braesch-Andersen S, Watanabe T, Satake M** (2005) A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Mol Biol Cell.* 16(4): 1617-28
- Tanentzapf G & Brown NH** (2006) An interaction between integrin and the talin FERM domain mediates integrin activation but not linkage to the cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* 8(6): 601-6
- Tautz D & Pfeifle C** (1989) A nonradioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98: 81-85
- Taylor MV, Beatty KE, Hunter, HK Baylies MK** (1995) *Drosophila* Mef2 is regulated by *twist* and is expressed in both the primordia and the differentiated cells of the embryonic somatic, visceral and heart musculature. *Mech. of Dev.* 50: 29-41
- Tepass U, Hartenstein V** (1994) The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol.* 161(2): 563-96
- Thorpe HM, Wilson SE, Smith MC** (2000) Control of directionality in the site-specific recombination system of the Streptomyces phage phiC31. *Mol Microbiol* 38(2): 232-41
- Totaro A, Paris S, Asperti C, de Curtis I** (2007) Identification of an intramolecular interaction important for the regulation of GIT1 functions. *Mol Biol Cell.* 18(12): 5124-38
- Turner CE, Brown MC, Perrotta JA, Riedy MC, Nikolopoulos SN, McDonald AR, Bagrodia S, Thomas S, Leventhal PS** (1999) Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol.* 145(4): 851-63
- van Impel A, Schumacher S, Draga M, Herz HM, Grosshans J, Müller HA** (2009) Regulation of the Rac GTPase pathway by the multifunctional Rho GEF Pebble is essential for mesoderm migration in the *Drosophila* gastrula. *Development.* 136(5): 813-22.
- Venugopala Reddy, G, Reiter, C, Shanbhag, S, Fischbach, KF, Rodrigues, V** (1999) Irregular chiasm-C-roughest, a member of the immunoglobulin superfamily, affects sense organ spacing on the *Drosophila* antenna by influencing the positioning of founder cells on the disc ectoderm. *Dev. Genes Evol.* 209: 581–591
- Vitale N, Patton WA, Moss J, Vaughan M, Lefkowitz RJ, Premont RT** (2000) GIT Proteins, A Novel Family of Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate-stimulated GTPase-activating Proteins for ARF6. *J Biol Chem* 275(18): 13901–13906
- Volpicelli-Daley LA, Li Y, Zhang CJ, Kahn RA** (2005) Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Mol Biol Cell* 16(10): 4495-508
- Wakelam MJ, Pette D** (1984) Myoblast fusion and inositol phospholipid breakdown: causal relationship or coincidence? *Ciba Found Symp.* 103: 100-18

- Way G, O’Luanaigh N, Cockcroft S** (2000). Activation of exocytosis by crosslinking of the IgE receptor is dependent on ARF-regulated phospholipase D in RBL-2H3 mast cells: evidence that the mechanism of activation is via regulation of PIP2
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ** (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* 118(Pt 5): 843-6
- West KA, Zhang H, Brown MC, Nikolopoulos SN, Riedy MC, Horwitz AF, Turner CE** (2001) The LD4 motif of paxillin regulates cell spreading and motility through an interaction with paxillin kinase linker (PKL). *J Cell Biol.* 154(1): 161-76.
- Wheeler GN, Hynes RO** (2001) The cloning, genomic organization and expression of the focal contact protein paxillin in *Drosophila*. *Gene.* 262(1-2): 291-9.
- Zallen JA, Cohen Y, Hudson AM, Cooley L, Wieschaus E, Schejter, ED** (2002) SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*. *J Cell Biol.* 156(4): 689-701
- Zeeh JC, Zeghouf M, Grauffel C, Guibert B, Martin E, Dejaegere A, Cherfils J** (2005) Dual Specificity of the Interfacial Inhibitor Brefeldin A for Arf Proteins and Sec7 Domains. *J Biol Chem* 281(17): 11805–11814
- Zhao ZS, Manser E, Loo TH, Lim L** (2000) Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol.* 20(17): 6354-63.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	Aminosäuresequenz	ORF	offener Leserahmen
A.dest	Aqua dest	PA	Phosphatidic acid
AK	Antikörper	Pak	P21-aktivierte Kinase
ANK	Ankyrin-Wiederholungen	PLD	Phospholipase D
Amp	Ampicillin	PBS	Paxillin-Bindestelle
Arf	ADP-Ribosylierungsfaktor	PBS-Puffer	Phosphat-gepufferte Salzlösung
bHLH-	basische Helix-Schleife-Helix-Domäne	PBT	PBS mit 0,5% Tris
bp	Basenpaare	PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	PH	Pleckstin-Homologie
DIG	Digoxigenin	PI(4,5)P2	Phosphoinositid, 4,5 Bisphosphat
DMF	Dimethylformamid	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNase A	Ribonuklease A
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Rols	Rolling Pebbles
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	rpm	Umdrehungen per Minute („rounds per minute“)
Duf	Dumbfounded	Rst	Roughest
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat	RT	Raumtemperatur
EtOH	Ethanol	sek	Sekunde
FBS	Fetales Kälber serum (fetal bovine serum)	SH3	Src-Homologie
FC	Founderzelle oder Gründerzelle	SHD	Spa Homologie-Domäne
FCM	Fusionskompetente Myoblaste	Sns	Sticks and Stones
F-PBS	Formaldehyd-PBS	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
GAP	GTPase aktivierendes Protein	TBSTT	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 und Triton-X
GEF	Guanine-Nukleotid-Austauschfaktor	TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor
Git	G-Protein-coupled-receptor-kinase interacting protein Git	T _M	Schmelztemperatur
h	Stunden	Twi	Twist
HRP	Meerrettich-Peroxidase	U	Unit
Ig	Immunoglobulin	UAS	Upstream Activating Sequence
KAc	Kaliumacetat	ü. N.	über Nacht
Kan	Kanamycin	ÜNK	Übernachtkultur
kb	Kilobasenpaar(e)	UTR	Nicht translatierte Region („untranslated region“)
Mb	Megabasenpaare	V	Volumen
MeOH	Methanol	v/v	Volumen pro Volumen
min	Minute	w/v	Gewicht pro Volumen
mRNA	"messenger"-Ribonukleinsäure	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-galaktopyranosid
NaAc	Natriumacetat	X-Phosphat/BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
NBT	4-Nitrotetrazoliumchlorid	ZNS	zentrales Nervensystem
OD	Optische Dichte	ZS/PBT	Ziegenserum in PBT

8. ANHANG

8.1. Auflistung der Gene in den verwendeten Defizienzen

Die hier aufgelisteten Daten stammen aus Flybase (www.flybase.de) und Referenzen darin (Stand Mai 2010).

8.1.1. Df(3L)ED5017

Bezeichnung: Df(3L)ED5017 (BL8102)

Deletierter zytologischer Bereich: 800A4- 80C2 22,828,597-22,991,401

Gen	Zytol. Position	Expression	Proteindomänen Molekulare/Biologische Funktion	Phänotyp beschrieben	vital /letal
jim	80A2-80A4	Follikelzellen, Mitteldarm, Hinterdarm	Zink-Finger C2H2 DNA-Bindedomäne Transkriptionsaktivität	Nicht bekannt	nicht bekannt
CG11226	80A4	nicht bekannt	keine beschrieben	Nicht bekannt	nicht bekannt
CG32462	80B1	nicht bekannt	keine beschrieben	Nicht bekannt	nicht bekannt
CG32459	80B1	nicht bekannt	keine beschrieben	Nicht bekannt	nicht bekannt
CG13239	80B1	nicht bekannt	keine beschrieben	Nicht bekannt	nicht bekannt
CG33169	80B1	nicht bekannt	keine beschrieben	Nicht bekannt	nicht bekannt
CG33170	80B1	nicht bekannt	keine beschrieben	Nicht bekannt	nicht bekannt
CG11137	80B1	nicht bekannt	Transmembran-Protein?	Nicht bekannt	nicht bekannt
Arf79F	80B1	nicht bekannt	ADP-Ribosylierungsfaktor, GTP-bindendes Protein, Vesikeltransport, Endosomal Transport	Nicht bekannt	nicht bekannt
CG11109	80B1	nicht bekannt	Pseudouridin Synthase rRNA Methyltransferase Aktivität	Nicht bekannt	nicht bekannt
Chro	80B1-80B2	nicht bekannt	Chromo-Domäne Chromatin-Organisation	Nicht bekannt	nicht bekannt
Ssl1	80B2	nicht bekannt	TFIIH-Transkriptionsfaktor-Complex-Domäne, C2H2-Zinkfinger-Domäne RNA-PolymeraseII Transkriptionsaktivität	Nicht bekannt	nicht bekannt
slif	80B2	nicht bekannt	Kationischer Aminosäuretransporter, Wachstum, Metabolische Prozesse	Wachstum,	Larval letal
CG11131	80B2	nicht bekannt	Gyr-Domäne	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG11133	80B2	nicht bekannt	ATP-abhängige Helikase Aktivität	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG12768	80B2-B3	nicht bekannt	keine beschrieben	Nicht bekannt	Nicht bekannt
Mes2	80C1	Mesoderm, Neuroektoderm	MADF-Domäne (DNA-Bindung) Transkriptionsfaktor	nach Überexpression in Mesoderm und Gliazellen	Larval letal (L1)
CG32461	80C1	nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG41451	80C1	nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG32457	80C2	nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt

8.1.2. Df(2L)ED1231

Bezeichnung: Df(2L)ED1231 (BL9174)

Deletierter zytologischer Bereich: 37C5-37E3 19,158,440-19,464,056

Gen	Zytol. Position	Expression	Proteindomänen Molekulare/Biologische Funktion	Phänotyp beschrieben	vital /letal
brat	37C1-37C6	Gehirn, ZNS, PNS, Ganglion Mutterzelle	Zink-Finger, NHL-Wiederholungen, Translations-Repressor-Bindung, SUMO-Bindung	nicht bekannt	letal
CG17568	37C6	nicht bekannt	Zink-Ionen Bindung	nicht bekannt	nicht bekannt
CG42688	37C6	nicht bekannt	keine	nicht bekannt	nicht bekannt
CG17567	37C7	nicht bekannt	keine	nicht bekannt	nicht bekannt
Gamma	37C7	Oozyte	Tubulin; GTP-Bindung, microtubules basierte Prozesse- Gametogenese	meiotic metaphaseI polar body nucleus, spindle oocyte	embryonal letal
pigeon	37C7	nicht bekannt	olfaktorisches Lernen, Assoziiertes Lernen	nicht bekannt	vital
drl	37C7	abdominal lateral transvers Muskel, optischer Lobus, anteriore Kommissure	Tyrosin-Proteinkinase-Domäne, WIF-Domäne; Wnt –Bindung; olfaktorisches Lernen, Axon Guidance, Gedächtnis, Muskelanheftung	Abdominal traverse Muskel, hypodermaler Muskel des larvalen Abdomen, Nervensystem	letal
CG31797	37D1	nicht bekannt	keine	nicht bekannt	nicht bekannt
CG17564	37D2	nicht bekannt	keine	nicht bekannt	nicht bekannt
CG10750	37D2	nicht bekannt	keine	nicht bekannt	nicht bekannt
dnt	37D2	tracheal pit, Ventrale Furche	Transmembran-Rezeptor-Tyrosin-Kinase , WIF-Domäne; Axon Guidance, Signal Transduktion, Muskelanheftung Speicheldrüsen	Speicheldrüsen	nicht bekannt
CG13086	37D2	nicht bekannt	C-Typ Lectin	nicht bekannt	nicht bekannt
CG17349	37D3	nicht bekannt	Parkin koreguliertes Protein	nicht bekannt	nicht bekannt
CG17350	37D3	nicht bekannt	keine	nicht bekannt	nicht bekannt
fon	37D3	nicht im Mesoderm	Hämolymp-Koaglutination, Metamorphose	Larve, Hämolymphe, pupale Kutikula	Semi-letal
CG17549	37D4	nicht im Mesoderm	keine	nicht bekannt	nicht bekannt
CG17544	37D4-5	nicht bekannt	Oxidase und Dehydrogenase Domäne; Pristanoyl-CoA Oxidase Aktivität; Oxidations-Reduktion, Fettsäure- β Oxidation	nicht bekannt	nicht bekannt
CG31798	37D4	nicht bekannt	TPR-ähnliches Motif	nicht bekannt	nicht bekannt
Pax	37D5	Mesoderm, leading edge	Zink-Finger, LD-Domänen; LIM-Domänen	Nicht bekannt	vital
lectin-GalC1	37D6	nicht bekannt	C-Typ Lectin; Galaktose-Bindung; Induktion bakterieller Agglutination	nicht bekannt	nicht bekannt
lectin-37Da	37D6	nicht bekannt	C-Typ Lectin; Galaktose-Bindung	nicht bekannt	nicht bekannt
lectin-37Db	37D7	nicht bekannt	C-Typ Lectin; Galaktose-Bindung	nicht bekannt	nicht bekannt
CG16771	37D7-E1	nicht bekannt	Alkaline Phosphatase Domäne	nicht bekannt	nicht bekannt
CG13085	37D7-E1	nicht bekannt	keine	nicht bekannt	nicht bekannt
CG9987	37D7	nicht bekannt	keine	nicht bekannt	nicht bekannt
Rab9	37-E1	nicht bekannt	Ras GTPase Domäne, GTPase Aktivität, Retrograder Transport , Endosom-> Golgi	nicht bekannt	nicht bekannt
CG10237	37-E1	nicht bekannt	Retinaldehyd-Bindung; Retinal-Bindung, VitaminE-Bindung	nicht bekannt	nicht bekannt
RanGAP	37-E1	zunächst ubiquitär, dann im ZNS, nicht im Mesoderm	Leucin-reiche Wiederholungen, Ran GTPase-Aktivase Aktivität; Nucleocytoplasmatischer Transport, Mitotische Chromosomensegregation	Spermatiden-Entwicklung	
Hs2st	37-E1	nicht bekannt	Heparan-Sulfat-Sulfotransferase Domäne; Tracheenentwicklung	Tracheensystem, dorsaler Zweig	nicht bekannt
Top2	37-E1	nicht bekannt	DNA-Topoisomerase-Aktivität, SUMO-Bindung, DNA-Bindung; mitotische Chromosomen Kondensation, DNA Topologie Veränderung, Mitotische Spindelorganisation	nicht bekannt	nicht bekannt
CG10026	37-E1	nicht im Mesoderm	Retinaldehyd-Bindung; Retinal-Bindung, VitaminE-Bindung	nicht bekannt	vital
tj	37-E1	Gonaden	Transkriptionsfaktor Domäne; Gonadenentwicklung	Ovar und Testis	vital, steril

8.1.3. Df(1)ED7374

Bezeichnung: Df(1)ED7374 (BL8954)

Deletierter Zytologischer Bereich: 15A1-15E3 16,589,220 - 17,001,665

Gen	Zytol. Position	Expression	Proteindomänen Molekulare/Biologische Funktion	Phänotyp beschrieben	vital /letal
CG4678	15A1-A3	nicht bekannt	Carboxypeptidase-Domäne	nicht bekannt	nicht bekannt
CG9676	15A1	nicht bekannt	Endopeptidase-Domäne	nicht bekannt	nicht bekannt
spherioide	15A1-A2	nicht bekannt	Peptidase-Domäne - Proteolyse	Immunsystem	nicht bekannt
CG9673	15A2-A3	nicht bekannt	Peptidase-Domäne - Proteolyse	nicht bekannt	nicht bekannt
CG4653	15A3	nicht bekannt	Peptidase-Domäne - Proteolyse	nicht bekannt	nicht bekannt
CG9672	15A3	nicht bekannt	Endopeptidase-Domäne Proteolyse	nicht bekannt	nicht bekannt
CG13008	15A3	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
CG34325	15A3	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
CG32572	15A3	nicht bekannt	nicht bekannt	Aggressives Verhalten	nicht bekannt
CG9634	15A3-A5	nicht bekannt	M13-Peptidase Domäne Metalloendopeptidase-Aktivität	nicht bekannt	nicht bekannt
TwdlX	15A3	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
TwdlY	15A3	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
TwdlZ	15A3	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt
CG32568	15A3	nicht bekannt	Phosphatase-Domäne	nicht bekannt	nicht bekannt
Twdla	15A4	nicht bekannt	Phosphatase-Domäne	nicht bekannt	nicht bekannt
if	15A5-A7	Mesoderm, Epithel,	Integrin-alpha-Untereinheit; Integrin-vermittelte Adhäsion	Muskulatur, Nervensystem, Epithel	embryonal letal
mRpL22	15A8	Ubiquitär Endoderm	Translation	Nicht bekannt	nicht bekannt
CG9609	15A8	Nicht bekannt	RNA polymerase III transcription factor activity	Nicht bekannt	nicht bekannt
Sap30	15A8	Nicht bekannt	transcription corepressor activity	Nicht bekannt	Nicht bekannt
Rrp45	15A8	Nicht bekannt	mRNA processing	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG4768	15A8	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG9132	15A8-9	Nicht bekannt	Endozytose, Alpha-Adaptin assoziiertes Protein	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG4789	15A9	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG9125	15A9	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG13005	15A9	Mesoderm	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
Ppk28	15A9-10	Nicht bekannt	Ionen-transport	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG4829	15A10	Nicht bekannt	protein-glutamine gamma-glutamyltransferase Aktivität	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG13004	15A11	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
RSG7	15B1	Nicht bekannt	G-protein coupled receptor protein-Signalweg	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG13003	15B1	Nicht im Mesoderm	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG4872	15B4	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG9104	15B4	Nicht bekannt	Entwicklung de Dentrinen	Nicht bekannt	Nicht bekannt
Rcp	15B4	Nicht bekannt	Hormon-Rezeptor-Komponente	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG9099	15B4	Nicht bekannt	Translationsinitiation	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG4880	15B4	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG13002	15B5	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG33252	15B5	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG4928	15C1-4	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
wus	15C4	Tracheen	Clearance der Tracheen	Tracheen	embryonal letal
CG13001	15C4	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG13000	15C4	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
RhoGap15B	15C4-5	Mesoderm	RhoGAP –Domäne, PLeckstrin-Homologie-Domäne	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG9086	15C5-6	Nicht bekannt	Protein-Ubitquitin-Ligase	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG9059	15D1	Nicht bekannt	Proteolyse, Peptidase Aktivität	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG12433	15D3	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG34326	15D4	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG8949	15E1	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG4949	15E1	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG8945	15E1	Nicht bekannt	Metallo-carboxypeptidase	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG4955	15E1	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG16700	15E2-3	Nicht bekannt	Aminosäure-Transporter	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG4991	15E3	Nicht bekannt	Aminosäure-Transporter	Nicht bekannt	Nicht bekannt
Arpc3B	15E3	Nicht bekannt	F-Aktin-Organisation; Arp2/3 Komplex	Nicht bekannt	Nicht bekannt
CG5004	15E3-5	Nicht bekannt	Pleckstrin-Homologie Domäne, SMAD-Domäne	Nicht bekannt	Nicht bekannt

•

9. DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Susanne Önel bedanken, dass ich diese Doktorarbeit in ihrem Labor durchführen konnte und die damit verbundenen Mittel, Kosten und finanziellen Möglichkeiten. Ein großer Dank gilt auch, dass ich die Möglichkeit bekommen habe, am GK und an vielen Anstaltungen, wie z.B. einer Vielzahl an Tagungen teilzunehmen. Vielmals bedanken möchte ich mich aber vor allem für ihre Unterstützung während der gesamten Zeit, sowie die vielen wertvollen Tips, Vorschläge und das Korrekturlesen bei Vorträgen, Berichten und schließlich dieser Arbeit.

Ein herzlichen Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bölker, der sich trotz Umzug die Zeit genommen hat, dass Zweitgutachten dieser Arbeit zu übernehmen und auch schon im Laufe der Arbeit Gutachten übernommen hat.

Ein großes Dankeschön gilt weiterhin Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl, die zunächst die offizielle Betreuung dieser Arbeit übernommen hat, und trotz ihrer „eigenen“ Doktoranden immer ein offenes Ohr für mich hatte und mit vielen Tips und Ratschlägen zur Seite gestanden hat. Weiterhin möchte ich mich für die Benutzung der gemeinsamen Laborräume, insbesondere des Fliegenraums und der Klimakammern, der Geräte, der Verbrauchsmittel, aber auch des Sozialraums und der Teilnahme an den netten Feiern bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jacob möchte ich danken, dass er der Prüfungskommission beisitzt. Vielmals möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, die Zellkulturexperimente bei ihm in der AG durchführen zu können, die Hinweise bei der Auswertung, aber auch für die zur Verfügung gestellten Vektoren. In diesem Zusammenhang möchte ich weiterhin Ksenia Astanina für die ersten Transfektionen der Zellen und Dr. Alexandra Elly für die nette Zusammenarbeit bei den ganzen Transfektionen bedanken.

Bei dem Graduiertenkolleg GK1216 „Intra- und Intercellular transport and communication“ möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung des Lebensunterhaltes, aber auch für die Möglichkeit, an vielen nationalen und internationalen Tagungen teilzunehmen, sowie für die vielfältige wissenschaftliche Weiterbildung bedanken. Allen Prüfern nochmals vielen Dank, dass sie sich für die Seminare und für die Teilnahme am „Advisory-Board“ Zeit genommen haben.

Ruth und Inge möchte ich für die Injektion der DNA in die Embryonen, bzw. für das Gießen der Fliegenflaschen, sowie das Herstellen der Nährmedien danken.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Sabina und Tim, die mich in jeder Hinsicht im Laboralltag und bei der Fliegenarbeit tatkräftig unterstützt und beigestanden haben, ohne sie wäre sonst vieles nicht möglich gewesen. Tim möchte ich auf diesem Wege alles erdenklich Gute für seine Zukunft wünschen!

Ganz lieben Dank geht an Lisa Klaus für ihre nette Zusammenarbeit und die „großartige“ Hilfe bei der Generierung der Mutante für d-git und ihrer immer guten Laune. Herzlichen Dank an Irene, die mit ihrer fröhlichen Art immer für Aufmunterung und gute Stimmung gesorgt hat, und über unsere netten und interessanten Diskussion über das D-Git Projekt. Auch wenn sie in Zukunft lernen sollte, sich besser an Termine zu halten

Bei Detlev möchte ich für die Tips, Beratungen und Hilfen am Mikroskop danken, bei Katja G. für die netten Photoshop-Beratungen und sonstigen Hilfen.

Der gesamten AG Önel und AG Renkawitz-Pohl möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre und vor allem die schönen Terrassen-Mittagspausen danken. Extra Dank an Verena und Christina H., die immer hilfsbereit waren und über die Fliegen geschaut haben, wenn ich mal unterwegs war...., bei Christina R. für die netten Gespräche und Tips.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für die schöne Zeit in Marburg und die vielen schönen Stunden neben der Arbeit bei Wein, Musik, Geburtstagen, Prosit Neujahr und allen anderen schönen Abenden bedanken. Ich hoffe, dass bleibt lange so erhalten. Danke Sandra, für die abwechslungsreichen und leckeren Mittwochsabende. Danke Aurelia, für die Droso Tips und die aufbauenden Worte.

Meiner Familie und auch Björns Familie ein großes Dankeschön für das Verständnis während der letzten Zeit.

Lieben Dank an Björn, der mich die ganze Zeit begleitet und auch in anstrengenden Zeiten zu mir gehalten und aufgebaut hat! Besonderen Dank für das tägliche Frühstück machen!

Den allergrößten Dank gilt meinen lieben Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich während der ganzen Zeit unterstützt und mich immer wieder ermutigt haben.

10. ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Der Arf-GEF Schizo fördert die Fusion der Myoblasten über die Aktivierung der D-Arf1-GTPase während der frühen Myogenese von *Drosophila melanogaster*, während der Arf-GAP D-Git in Kooperation mit D-Arf6 die Wegfindung der Muskeln in der späten Myogenese beeinflusst

unter der Leitung von Frau Prof. Dr.Önel (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

(Christine Dottermusch)

11. VORLÄUFIGE PUBLIKATIONSLISTE

Dottermusch, C.; Groth, V.; Elly, A.; Jacob, R. & Önel, S.F.

N-Cadherin interacts with the *Drosophila* Arf1-GEF Schizo/Loner to direct myoblast fusion.

Einreichung zur Veröffentlichung vorraussichtlich Dezember 2010

Dottermusch, C.; Hofer, I.; Klaus, E.S. & Önel, S.F.

The *Drosophila* Arf-GAP D-Git acts through the Arf-GTPase D-Arf6 and the SH2-SH3 adaptor Dock to promote myotube projection and attachment of ventral muscles in concert with the Slit/Robo signaling pathway.

Einreichung zur Veröffentlichung vorraussichtlich Februar 2011

Önel, S.F., Dottermusch, C., Sickmann, A., Buttgereit, D., Renkawitz-Pohl, R. (2010)

Role of the actin cytoskeleton within FuRMAS during *Drosophila* myoblast fusion and first functionally conserved factors in vertebrates.

in "Cell Fusions: Regulation and Control" ed Lars-Inge Larsson, Springer-Verlag, Berlin